

**Untersuchungen über Acyl-CoA-Dehydrogenasen
im Abbau ungesättigter Fettsäuren**

DISSERTATION

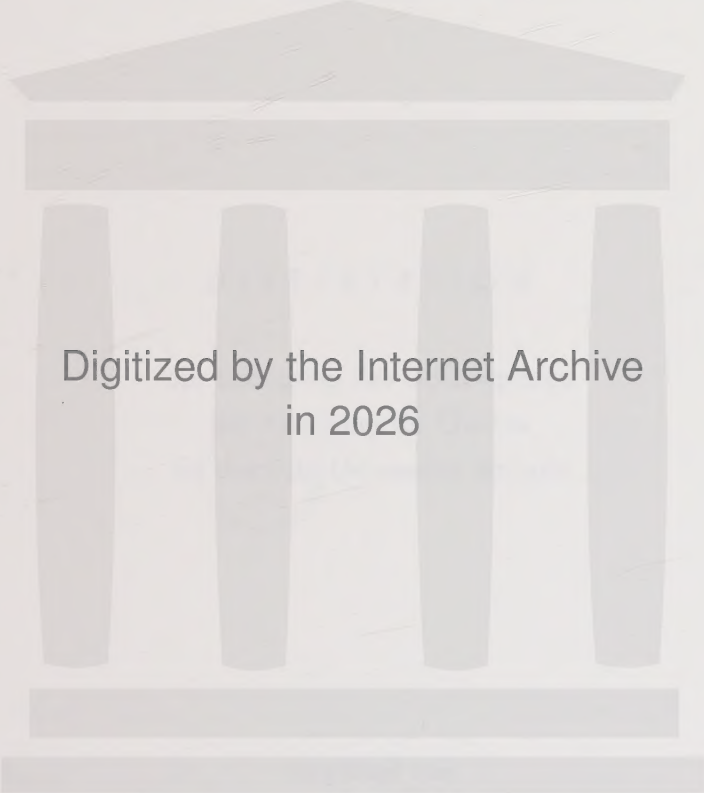
zur Erlangung des Doktorgrades
der Abteilung für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

VERONIKA DOMMES

aus Dinslaken

Bochum 1979



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546404_0007

**Untersuchungen über Acyl-CoA-Dehydrogenasen
im Abbau ungesättigter Fettsäuren**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Abteilung für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

VERONIKA DOMMES

aus Dinslaken

Bochum 1979



Tag der mündlichen Prüfung:

27.6.1979

Referent:

Prof. Dr. W-H. Kunau

Korreferent:

Prof. Dr. O. Pongs

Ein Teil dieser Arbeit wurde 1976 unter dem Titel:
"A Convenient Assay for Acyl-CoA-Dehydrogenases"
in Analytical Biochemistry 71, S. 571 - 578 veröffentlicht.

Weitere Teile wurden auf den Tagungen der Gesellschaft für
Biologische Chemie 1976 in München unter dem Titel:
"Nachweis und partielle Reinigung von Acyl-CoA-Dehydrogenasen
aus Rinderleber" (Z. Physiol. Chem. 357, 255 (1976)
und 1978 in Konstanz unter dem Titel:
"Three Distinct Acyl-CoA Dehydrogenases from Bovine Liver"
(Z. Physiol.Chem. 359, 1076 (1978)) vorgestellt.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Mutter, die mir trotz des frühen Todes meines Vaters das Chemiestudium ermöglichte.

Ich danke Herrn Professor Dr. W.-H. Kunau für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Arbeitsmittel und für die Betreuung und Beratung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. O. Pongs danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Allen Angestellten und Mitarbeitern der Institute für Physiologische Chemie I und II der Ruhr-Universität Bochum, insbesondere der Arbeitsgruppe für Bioorganische Chemie, danke ich für ihre Mitwirkung am Zustandekommen dieser Arbeit und für ihre kollegiale Hilfe.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungen	I
Nomenklatur der Fettsäuren	II
Nomenklatur der Acyl-CoA-Dehydrogenasen	III
Verzeichnis der β -Oxidationsenzyme	IV
1. Einführung	1
1.1. β -Oxidation und partieller Abbau hochungesättigter Fettsäuren	1
1.2. Acyl-CoA-Dehydrogenasen	6
1.3. Themenstellung	9
2. Methoden	11
2.1. Verwendete Geräte	11
2.2. Analytische Methoden	12
2.2.1. Enzymbestimmungen	12
2.2.2. Proteinbestimmungsmethoden	13
2.2.3. Analytische Polyacrylamidgelelektrophoresen	14
2.2.3.1. System Maurer 1	14
2.2.3.2. System Maurer 6	15
2.2.3.3. Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen (SDS-Elektrophorese)	16
2.2.3.4. Gelelektrophorese nativer Proteine im Polyacrylamid-Dichtegradienten	17
2.2.4. Isoelektrische Focussierungen	17
2.2.4.1. Analytische Elektrofocussierung (pH 3,5 - 9,5)	17
2.2.4.2. Analytische Elektrofocussierung (pH 4 - 7) zur Bestimmung der isoelektrischen Punkte	18

	Seite
2.3.	Entwicklung eines Enzymtests für Acyl-CoA-Dehydrogenasen 19
2.4.	Darstellung von Ausgangsmaterial 20
2.4.1.	Darstellung von Rinderlebermitochondrien 20
2.4.2.	Darstellung von Acetontrockenpulver 20
2.4.3.	Trockenpulverextraktion 21
2.4.4.	Bestimmung von Acyl-CoA-Dehydrogenaseaktivitäten in frischer Rinderleber 21
2.5.	Austestung von Reinigungsmethoden 22
2.5.1.	Ammoniumsulfatfällungen 22
2.5.2.	Adsorption an Alumina C _y 23
2.5.3.	Adsorption an DEAE-Sephadex und DEAE-Cellulose 23
2.5.4.	Gelchromatographie an Sephadex G-150 und Sephadex G-200 24
2.5.5.	Präparative Elektrophorese 25
2.5.6.	Präparative Elektrofocussierung 26
2.6.	Gewinnung von gereinigten Acyl-CoA-Dehydrogenasen 27
2.7.	Herstellung der Substrate 28
2.7.1.	Hydrierung der Monoin- und Polyinsäuren 28
2.7.2.	Isolierung der Hydrierungsprodukte unter gleichzeitiger Überführung in die Methylester 29
2.7.3.	Reinigung der cis-Monoen- und all-cis-Polyensäuremethylester durch Sibernitrat-Chromatographie 29
2.7.4.	Gaschromatographische Überprüfung der Fettsäuremethylester 30
2.7.5.	Gewinnung der freien Fettsäuren 30
2.7.6.	Darstellung von Methylencyclopropylessigsäure 31

	Seite
2.7.7.	Darstellung der Acyl-CoA-Ester 31
2.7.8.	Referenzsubstanzen für die Gaschromatographie 32
3.	Ergebnisse 33
3.1.	Kontinuierliche photometrische Enzym- bestimmung 33
3.1.1.	Wahl des primären Elektronenakzeptors EA I 33
3.1.2.	Wahl des sekundären Elektronenakzeptors EA II 39
3.1.3.	Testsystem für Acyl-CoA-Dehydrogenasen 41
3.2.	Analytische Differenzierung der Acyl-CoA- Dehydrogenasen 48
3.3.	Enzymreinigung 55
3.3.1.	Darstellung von Ausgangsmaterial 55
3.3.2.	Bestimmung von Acyl-CoA-Dehydrogenasen in frischer Rinderleber 55
3.3.3.	Stabilität der Acyl-CoA-Dehydrogenasen im Rohextrakt 57
3.3.4.	Überprüfung verschiedener Reinigungsverfahren im Rohextrakt 59
3.3.4.1.	Ammoniumsulfatfällung 60
3.3.4.2.	Adsorption an Alumina C _γ 62
3.3.4.3.	Adsorption an DEAE-Sephadex und DEAE-Cellulose 63
3.3.4.4.	Gelfiltration an Sephadex G-150 66
3.3.4.5.	Präparative Elektrophorese 67
3.3.4.6.	Präparative Elektrofocussierung 68
3.3.5.	Reinigungsverfahren 68
3.4.	Charakterisierung der gereinigten Acyl-CoA- Dehydrogenasen 84

	Seite
3.4.1. Molekulargewichtsbestimmungen	84
3.4.2. Bestimmung der isoelektrischen Punkte	87
3.4.3. pH- und Temperaturabhängigkeit der Acyl-CoA-Dehydrogenasen	89
3.5. Substratspezifität der Acyl-CoA-Dehydrogenasen	92
3.5.1. Gesättigte Acyl-CoA-Ester	92
3.5.2. Kurzkettige ungesättigte Acyl-CoA-Ester	95
3.5.3. Ungesättigte Acyl-CoA-Ester der Kettenlänge C ₁₀	97
3.5.4. Hochungesättigte essentielle Acyl-CoA-Ester	99
3.5.5. Reaktionen von DH II und DH III mit einer neuen Modells substanz	99
3.6. Bestimmung der Reaktionsprodukte	101
3.6.1. Produktanalyse durch photometrische Messung bei 296 nm	101
3.6.2. Produktanalyse mit radioaktiv markierten Substraten	102
4. Diskussion	109
4.1. Analytik	109
4.1.1. Kontinuierliche photometrische Bestimmung von Acyl-CoA-Dehydrogenasen	109
4.1.2. Differenzierung der Acyl-CoA-Dehydrogenasen	114
4.2. Enzymreinigung	116
4.2.1. Kritik an bisherigen Reinigungsverfahren: Mangelnde Analytik	116
4.2.2. Optimierung der Reinigungsmethoden und Aufbau des Reinigungsschemas	119
4.3. Charakterisierung der gereinigten Acyl-CoA-Dehydrogenasen	121

	Seite
4.4. Substratspezifität der Acyl-CoA-Dehydrogenasen	124
4.4.1. Gesättigte Acyl-CoA-Ester	125
4.4.2. Kurzkettige ungesättigte Acyl-CoA-Ester ($< C_{10}$)	131
4.4.3. Mittel- und langkettige ungesättigte Acyl-CoA-Ester ($> C_8$)	134
4.5. Rolle der Acyl-CoA-Dehydrogenasen im Abbau von Linol- und Linolensäure	137
5. Zusammenfassung	147
Literaturverzeichnis	149

Abkürzungen

BICIN	=	N,N-Bis(2-hydroxyäthyl)glycin
DCI	=	2,6-Dichlorphenolindophenol
DTE	=	Dithioerythritol
DTNB	=	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)
EA	=	Elektronenakzeptor
ETF	=	Electron Transferring Flavoprotein
HEPES	=	2-[4-(-Hydroxyäthyl)-piperazinyl-(1)]äthansulfonsäure
INT	=	Jodnitrotetrazoliumchlorid
IP	=	Isoelektrischer Punkt
MCPA	=	Methylencyclopropylelessigsäure
MB	=	Meldolablauf = 7-Dimethylamino-1,2-benzophenoxaziniumchlorid
PMS	=	Phenazinmethosulfat
SDS	=	sodium dodecyl sulfate
TEMED	=	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin

Nomenklatur der Fettsäuren

Da die Fragestellung der vorliegenden Arbeit die Oxidation ungesättigter Fettsäuren betraf, ist die Abkürzungsschreibweise an diesen ungesättigten Verbindungen orientiert. Die beiden mittleren, in Bindestriche eingeschlossenen Zahlen geben die Anzahl der C-Atome in der Kohlenstoffkette und, durch einen Doppelpunkt abgetrennt, die Anzahl der Doppelbindungen wieder. Die Positionen der Doppelbindungen sind vom Carboxylende aus aufgezählt und der Kettenlänge vorangestellt. Dem durch diese Zahlenfolge symbolisierten Acylrest ist eine Buchstabenfolge angehängt, die angibt, ob die freie Säure (-S), der Coenzym A-Ester (-CoA) oder der Methylester (-ME) vorliegt.

Beispiel:

Linolsäure = 9cis,12cis-Octadecadiensäure = 9,12-18:2-S

Die Geometrie der Doppelbindung (cis = c oder trans = t) ist nur für die ungesättigten Säuren der Kettenlänge C_{10} und für die durch die Acyl-CoA-Dehydrogenase eingeführte 2t-Doppelbindung angegeben. Alle Doppelbindungen in den erwähnten hochungesättigten Fettsäuren haben cis-Konfiguration. Gesättigte Fettsäuren werden entsprechend der gewählten Nomenklatur als 4:0-S, 6:0-CoA, 8:0-ME usw. bezeichnet.

Außerdem werden für Doppelbindungen enthaltenden Fettsäuren die Bezeichnungen En-Säuren oder Monoen- bzw. Polyensäuren verwendet. Entsprechend heißen die Dreifachbindungen enthaltenden Fettsäuren In-Säuren oder Monoin- bzw. Polyinsäuren. Die Abkürzungsschreibweise für In-Säuren entspricht der für En-Säuren. Die Positionen der Dreifachbindungen werden hier durch eine hochgestellte Zahl angegeben.

Beispiel:

Taririnsäure = 6-Octadecinsäure = 6-18¹-S

Nomenklatur der Acyl-CoA-Dehydrogenasen

In der Literatur liegen für die Benennung der Kettenlängenspezifität der Acyl-CoA-Dehydrogenasen verschiedene Systeme vor. Es wurden nach den Testsubstraten, nach den Kettenlängenbereichen, die vom jeweiligen Enzym umgesetzt werden, oder nach der Farbe der Enzyme folgende Bezeichnungen verwendet: Butyryl-CoA-Dehydrogenase = short chain acyl dehydrogenase = G (green);

Octanoyl-CoA-Dehydrogenase = medium chain acyl dehydrogenase = general acyl dehydrogenase = Y (yellow);

Palmitoyl-CoA-Dehydrogenase = long chain acyl dehydrogenase = Y' (yellow).

Alle diese Bezeichnungen sind ungenau. Die Benennungen short chain, general und long chain acyl dehydrogenase, die die Kettenlängenspezifitäten am besten widerspiegeln, lassen sich nur sehr umständlich ins Deutsche übertragen (kurze Ketten umsetzende Acyl-CoA-Dehydrogenase usw.). Daher wurden in der vorliegenden Arbeit die kurzen Bezeichnungen DH I, DH II und DH III gewählt. Sie sind mit den oben genannten Namen synonym. Ihre Kettenlängenspezifitäten werden im Kapitel 3.5. genau beschrieben.

Verzeichnis der β -Oxidationsenzyme

- (EC 1.3.99.3) Acyl-CoA-Dehydrogenase oder
Acyl-CoA: Akzeptor-Oxidoreduktase
- (EC 4.2.1.17) Enoyl-CoA-Hydratase oder
3-Hydroxyacyl-CoA-Hydrolase
- (EC 1.1.1.35) 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase oder
L-3-Hydroxyacyl-CoA: NAD^+ -Oxidoreduktase
- (EC 2.3.1.16) 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase oder
Acetyl-CoA-Acyltransferase
- (EC 1.3.1.-) 4-Enoyl-CoA-Reduktase oder
Acyl-CoA: NADP^+ -Oxidoreduktase
- (EC 5.3.3.-) 3cis,2trans-Enoyl-CoA-Isomerase
- (EC 5.1.2.-) 3-Hydroxyacyl-CoA-Epimerase
- (EC 1.3.1.8) 2-Enoyl-CoA-Reduktase oder
Acyl-CoA: NADP^+ -Oxidoreduktase

1. Einführung

1.1. β -Oxidation und partieller Abbau hochungesättigter Fettsäuren

Der Abbau der gesättigten Fettsäuren durch β -Oxidation, 1905 von Knoop (1) vermutet und experimentell wahrscheinlich gemacht, wurde nach der Entdeckung des Coenzyms A 1951-1957 bestätigt (2-4), in seinen Einzelschritten aufgezeigt (5-7) und durch die Isolierung der beteiligten Enzyme bewiesen (8-15) (Abb. 1).

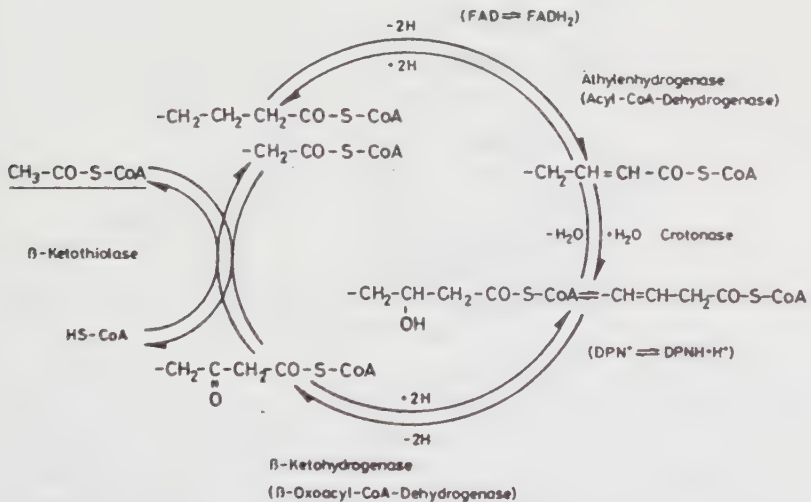


Abbildung 1: Der β -Oxidationszyklus, wie ihn Lynen 1955 beschrieb (7).

Stoffel und Mitarbeiter untersuchten Anfang der sechziger Jahre die Reaktionen, die den Abbau ungesättigter Fettsäuren an den β -Oxidationszyklus angliedern und isolierten und charakterisierten zwei zusätzliche Enzyme (16-18) (Abb. 2).

Die β -Oxidation als Abbauprinzip der Fettsäuren, zumindest soweit sie aus den Triglyceriden der Nahrungs- und Depotfette stammen, war somit im Jahr 1965 aufgeklärt, obwohl in vivo kein Zwischenprodukt nachweisbar ist.

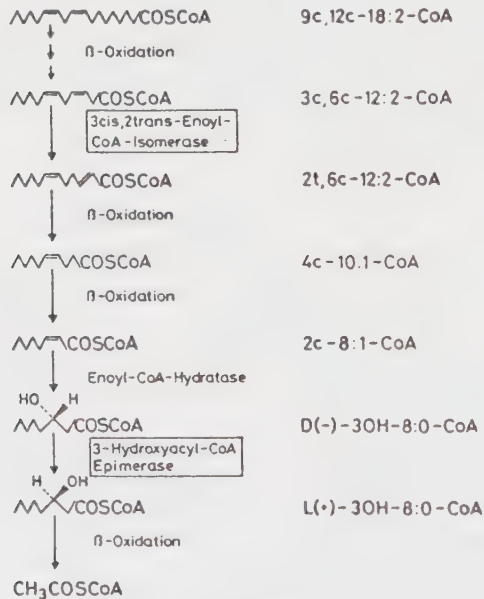


Abbildung 2: β -Oxidation der Linolsäure, Reaktionssequenz nach Stoffel und Caesar (17). Die beiden zusätzlichen Enzyme, die Stoffel zum Abbau ungesättigter Fettsäuren beschreibt, sind umrahmt.

Ab Mitte der sechziger Jahre erschien eine Reihe von Arbeiten zum Abbau der hochungesättigten Fettsäuren, die Bestandteile der Phospholipide in den Membranen sind. Hier fand man, daß zwar die Eicosapolyensäuren (C₂₀) in vivo ohne Anhäufung von Zwischenprodukten durch β -Oxidation abgebaut werden (19).

Nach Fütterung von Docosapolyensäuren (C_{22}) sind jedoch als Abbauprodukte Eicosapolyensäuren nachweisbar, also die um eine C_2 -Einheit verkürzten Säuren (20), zum Teil nach zusätzlichem Verlust einer Doppelbindung (21-24). Kunau konnte durch in viro-Studien mit isolierten Mitochondrien (25) folgende generelle Prinzipien dieses "partiellen Abbaus" hochungesättigter Fettsäuren aufzeigen (Abb. 3):

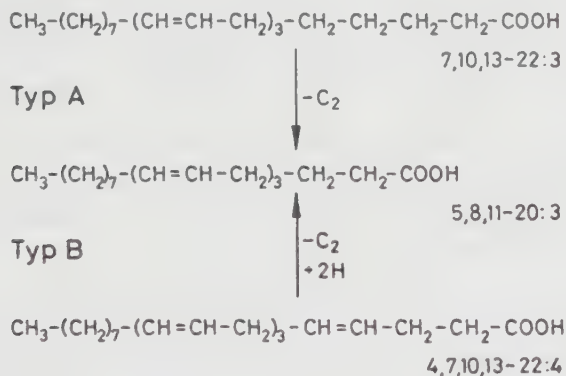


Abbildung 3: Partieller Abbau von Docosapolyensäuren

1. Docosapolyensäuren, deren erste Doppelbindung sich in Position 7 befindet, werden kettenverkürzt zu Eicosapolyensäuren mit der ersten Doppelbindung in Position 5 (=Typ A).
2. Docosapolyensäuren, deren erste Doppelbindung sich in Position 4 befindet, werden kettenverkürzt, verlieren aber zusätzlich auch diese erste Doppelbindung (=Typ B).

Es wird allgemein angenommen, daß die Kettenverkürzung durch β -Oxidation erfolgt (26).

Ob die Reduktion vor oder nach der Kettenverkürzung abläuft, war lange Zeit ungeklärt. Während Schlenk et al. die Kettenverkürzung für den ersten Schritt hielten (24), schloß Kunau aus

seinen Versuchen auf eine vorangehende Reduktion (25). Bartnik und Kunsu (27) konnten durch Einsetzen doppelt markierter Säuren ($[1-^{14}\text{C}]$ und an allen Doppelbindungen $[3\text{H}]$) zeigen, daß die reduzierte, nicht verkürzte Säure dasselbe Isotopenverhältnis aufweist wie die Ausgangssäure, daß sie also nicht durch Wiederaufbau aus der kettenverkürzten, reduzierten Säure entsteht. Ein nur verkürztes, nicht reduziertes Zwischenprodukt konnte nicht nachgewiesen werden.

Die Reaktion $4,7,\dots-22:n\text{-Säure} \longrightarrow 7,\dots-22:(n-1)\text{-Säure}$ fordert ein Enzym oder Enzymsystem, das die Doppelbindung in Position 4 zu reduzieren vermag.

Bartnik (28) zeigte, daß diese Reaktion auch im Trockenpulverextrakt von Mitochondrien abläuft und daß sie streng NADPH-abhängig ist. Er konnte "4-Enoyl-CoA-Reduktase-Aktivität" aus Rinderleber partiell anreichern.

Die Messungen zur Charakterisierung der 4-Enoyl-CoA-Reduktase in angereicherten Enzymfraktionen wurde jedoch nicht mit Docosapolyensäure-CoA-Estern, sondern mit der Modells substanz 4cis-Decenoyl-CoA (4c-10:1-CoA) durchgeführt. Diese Modells substanz war aus mehreren Gründen gewählt worden:

- das Carboxylende der 4c-10:1-S ist identisch mit dem Carboxylende der Docosapolyensäuren, die die erste Doppelbindung in Position 4 besitzen.
- das Methylenende der 4c-10:1-S ($\omega 6$) ist identisch mit dem Methylenende der essentiellen hochungesättigten Fettsäuren der Linolsäurefamilie.
- 4c-10:1-CoA entsteht nach heute herrschender Auffassung als Zwischenprodukt bei der β -Oxidation der Linolsäure (vgl. Abb. 2).
- 4c-10:1-CoA wird von der 4-Enoyl-CoA-Reduktase durch Einbau von Wasserstoff aus NADPH reduziert.

Als Bartnik diesen Versuch mit $4S-[4-^3H]$ -NADPH (B-Form) durchführte, konnte er radiogaschromatographisch tritiummarkiertes $10:0$ -CoA und $8:0$ -CoA nachweisen. Daraus zogen Kunau und Bartnik den Schluß, daß $4c-10:1$ -CoA zu $10:0$ -CoA reduziert und durch β -Oxidation nach Lynen zu $8:0$ -CoA abgebaut wird. Diese Hypothese steht im Widerspruch zum heute allgemein akzeptierten Abbauweg nach Stoffel: Stoffel ging von der experimentell nie bewiesenen Annahme aus, daß $4c-10:1$ -CoA durch β -Oxidation zu $2c-8:1$ -CoA kettenverkürzt wird und zeigte, daß $2c$ -ungesättigte Fettsäure-CoA-Ester unter Mitwirkung der von ihm nachgewiesenen β -OH-Acyl-CoA-Epimerase zu Acetyl-CoA abgebaut werden (16) (Abb. 4):

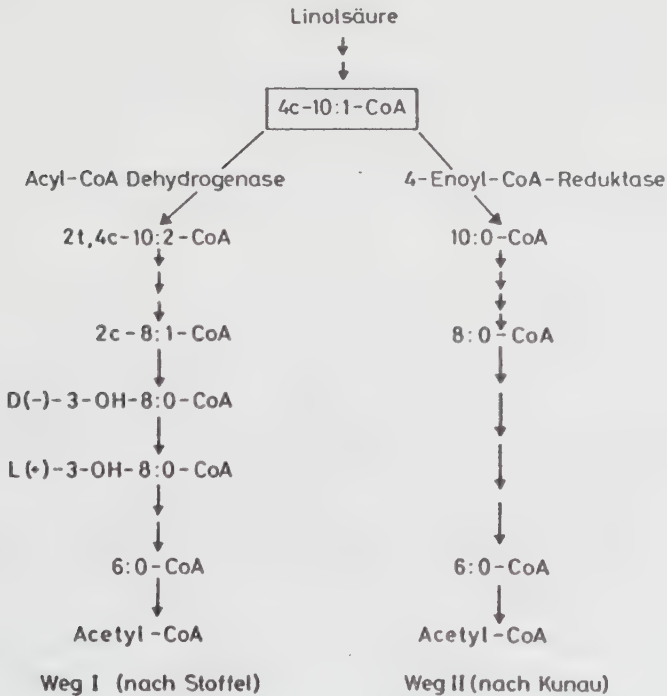


Abbildung 4: Alternative Abbauwege für $4c-10:1$ -CoA.

Es stand demnach die Frage offen, wie 4c-10:1-CoA, ein Zwischenprodukt im katabolen Linolsäurestoffwechsel, abgebaut wird. Ihre Beantwortung ist nicht nur deshalb von Interesse, weil Linolsäure als essentielle Fettsäure eine zentrale Rolle im Stoffwechsel der ungesättigten Fettsäuren spielt und alle hochungesättigten Säuren der Linolsäure-Familie ($\omega 6$) zum selben Zwischenprodukt führen, sondern auch, weil alle ungesättigten Fettsäuren, deren Doppelbindungen sich an geradzahligen C-Atomen befinden, im Verlauf der β -Oxidation zu 4c-ungesättigten Zwischenprodukten umgewandelt werden. Für diese ergibt sich dieselbe Problematik, die oben für die Linolsäure exemplarisch angezeigt ist.

Zur Lösung wurde das Problem eingegrenzt auf den ersten Schritt zum Abbau des 4c-10:1-CoA. Es war zu klären,

1. ob 4c-10:1-CoA durch die Acyl-CoA-Dehydrogenase zu 2t,4c-10:2-CoA oxidiert wird,
2. ob 4c-10:1-CoA durch die 4-Enoyl-CoA-Reduktase zu 10:0-CoA reduziert wird,
3. ob beide Enzyme um dasselbe Substrat konkurrieren.

In der vorliegenden Arbeit sollte der erste Punkt untersucht werden, ob 4c-10:1-CoA ein Substrat für die Acyl-CoA-Dehydrogenase ist. Als Enzymquelle wurde Rinderleber ausgewählt, weil enzymologische Studien über β -Oxidation im tierischen System bislang bevorzugt an Leberenzymen durchgeführt worden sind und weil die 4-Enoyl-CoA-Reduktase parallel zu dieser Arbeit von Kunau und P. Dommès auch aus Rinderleber charakterisiert wurde (29).

1.2. Acyl-CoA-Dehydrogenasen

Obwohl seit über 20 Jahren Arbeiten über Acyl-CoA-Dehydrogenase publiziert worden sind, ist nur relativ wenig über

ihre Enzymologie bekannt. Dies ist umso erstaunlicher, als sie eine zentrale Stellung im Intermediärstoffwechsel einnimmt, etwa vergleichbar den Enzymen der Glykolyse.

Im Rahmen der Untersuchungen der β -Oxidation war die Acyl-CoA-Dehydrogenaseraktion der am schwierigsten faßbare Schritt. Die Bildung der α,β -ungesättigten Säure als einleitende Reaktion der β -Oxidationssequenz war in den Diskussionen um den Fettsäureabbau wohl am heftigsten umstritten (30-34). Die erste Arbeit über "Fettsäuredehydrogenase", die eine Menge von Daten und korrekten Schlussfolgerungen enthielt und 1943 von F. Mazza in italienischer Sprache publiziert wurde (34), fand (aus Sprachschwierigkeiten?) keine Anerkennung.

Nach der Aufklärung des Fettsäurezyklus wurde versucht, die einzelnen Enzyme zu isolieren und zu charakterisieren. 1953 beschrieben Seubert und Lynen (35) in Schafleberextrakt eine "Äthylen-Reduktase", wahrscheinlich ein Flavoprotein, das die Rückreaktion 2t-ungesättigte Säure $\rightarrow$ gesättigte Säure unter Oxidation von Safranin katalysiert. Ob es sich bei diesem Enzym um eine Acyl-CoA-Dehydrogenase handelt, wurde niemals bewiesen.

1954 erschien aus der Arbeitsgruppe in Madison, Wisconsin (Beinert, Crane, Green, Hauge, Mahler) eine Reihe von Publikationen über Acyl-CoA-Dehydrogenasen (8-10, 36-44). Ihnen gelang der Nachweis, die Reinigung und die Charakterisierung von drei verschiedenen Acyl-CoA-Dehydrogenasen aus Schweineleber. Alle drei sind Flavoproteine mit einem Molekulargewicht von 120 000 - 220 000 (8). Sie unterscheiden sich in der Substratspezifität: Die "Butyryl-CoA-Dehydrogenase" setzt Fettsäuren der Kettenlänge C_4 bis C_8 um, die "Allgemeine Acyl-CoA-Dehydrogenase" Substrate von C_4 bis C_{16} und die "Palmityl-CoA-Dehydrogenase" Fettsäuren mit einer Kettenlänge von C_6 bis C_{16} (37). Alle Acyl-CoA-Dehydrogenasen führen in gesättigte Fettsäure-CoA-Ester eine trans-Doppelbindung in Position 2 ein. Die abstrahierten Wasserstoffe werden vom $FADH_2$ der Dehy-

drogenasen auf ein ebenfalls flavinhaltiges Transportprotein, das Electron Transferring Flavoprotein (ETF) übertragen (45), welches sie, eventuell über weitere Elektronentransportproteine, in die Atmungskette einschleust. So wurde z.B. von Ruzicka und Beinert ein Eisen-Schwefel-Protein beschrieben (46) und isoliert (47), das Wasserstoff von ETF auf Ubichinon überträgt und als ETF-Ubichinon-Oxidoreduktase bezeichnet wurde.

Seit diesen grundlegenden Arbeiten der Arbeitsgruppe in Madison sind noch einige andere Publikationen zum Thema "Acyl-CoA-Dehydrogenase" erschienen:

1961 beschrieben Gelbard und Goldman (48) die Anreicherung von Butyryl-CoA-Dehydrogenase und ETF aus *Mycobacterium tuberculosis*; 1966 isolierte Hoskins (49) Butyryl-CoA-Dehydrogenase aus Affenleber; 1971 untersuchten Engel und Massey (50,51) Butyryl-CoA-Dehydrogenase aus *Peptostreptococcus elsdenii**; Holland et al. beschrieben 1973 die Reinigung von Butyryl-CoA-Dehydrogenase und Octanoyl-CoA-Dehydrogenase aus Rinderleber (53); Hall et al. (54,55) reinigten Allgemeine Acyl-CoA-Dehydrogenase und ETF aus Schweineleber (1975) und Acyl-CoA-Dehydrogenasen und ETF aus Rinderherz (1976).

Zu Beginn dieser Arbeit lagen also ungefähr 20 Publikationen über Acyl-CoA-Dehydrogenasen vor. Trotzdem war der Kenntnisstand aus folgenden Gründen relativ gering:

1. Ein großer Teil der Arbeiten befaßte sich nur mit der kurzkettigen Fettsäuren umsetzenden Butyryl-CoA-Dehydrogenase, so daß bis heute über die Anzahl der verschiedenen Acyl-CoA-Dehydrogenasen in den meisten Geweben und Organismen keine Untersuchungen vorliegen.
2. Es existierte kein verlässlicher Enzymtest. Verschiedene Testverfahren waren beschrieben, doch sie waren entweder

* heute *Megasphaera elsdenii* (52)

nicht kontinuierlich oder wegen der Verwendung autoxidabler Substanzen schlecht reproduzierbar oder an das Vorhandensein endogener Faktoren gebunden, deren Konzentrationsänderungen durch die angewandten Reinigungsverfahren nicht kontrollierbar waren.

3. Da kein spezifisches Substrat für die einzelnen nebeneinander vorkommenden Acyl-CoA-Dehydrogenasen bekannt war (überlappende Kettenlängenspezifität), gab es keinen geeigneten Parameter für die Kontrolle der Trennung der Acyl-CoA-Dehydrogenasen voneinander. Die gemessenen Enzymaktivitäten (z.B. mit 4:0-CoA, 8:0-CoA oder 16:0-CoA als Substrat) waren immer Mischaktivitäten. Daher ließ sich bei Reinigungsschritten nicht feststellen, wieviele dieser Acyl-CoA-Dehydrogenasen im Ausgangsextrakt vorhanden waren und wieviel von einer bestimmten Acyl-CoA-Dehydrogenase verloren ging.

Aus diesen Gründen war zu Beginn dieser Arbeit weder ein Reinigungsverfahren für die Acyl-CoA-Dehydrogenasen aus Rinderleber vorhanden, noch war die Anzahl der in Rinderleber vorkommenden Dehydrogenasen bekannt.

Untersuchungen mit ungesättigten Acyl-CoA-Estern als Substraten waren an Acyl-CoA-Dehydrogenasen noch nie durchgeführt worden.

1.3. Themenstellung

Um zu klären, wie die Acyl-CoA-Dehydrogenasen am Abbau ungesättigter Fettsäuren und insbesondere am Abbau von 4c-10:1-CoA beteiligt sind, wurden in dieser Arbeit Untersuchungen zu folgenden Themen durchgeführt:

1. Es sollte ein Verfahren erarbeitet werden, das eine kontinuierliche photometrische Bestimmung von Acyl-CoA-Dehydrogenaseaktivitäten ermöglicht.

2. Es sollte eine Methode entwickelt werden, um zwischen den einzelnen Acyl-CoA-Dehydrogenasen zu unterscheiden.
3. Die Anzahl der in Rinderleber vorhandenen Acyl-CoA-Dehydrogenasen sollte bestimmt werden.
4. Die verschiedenen Acyl-CoA-Dehydrogenasen der Rinderleber sollten voneinander abgetrennt werden.
5. Es sollte versucht werden, die einzelnen Acyl-CoA-Dehydrogenasen zu reinigen und zu charakterisieren.
6. Die Substratspezifitäten gegenüber gesättigten Säuren sollten mit den in Schweineleber beschriebenen verglichen werden.
7. Das Verhalten der Acyl-CoA-Dehydrogenasen gegenüber ungesättigten Säuren sollte untersucht werden. Dabei war insbesondere die Frage zu klären, ob die 4cis-ungesättigten Fettsäure-CoA-Ester umgesetzt werden.

2. Methoden

2.1. Verwendete Geräte

Die photometrischen Bestimmungen von Enzymaktivitäten wurden an einem Zweistrahlphotometer der Fa. Zeiss, Oberkochen, dem DMR 21, durchgeführt. Mit diesem Gerät wurden auch die Absorptionsspektren aufgezeichnet.

Für zeitunabhängige photometrische Messungen bei konstanter Wellenlänge wurde das Photometer PMQ II von Zeiss benutzt.

Das Scannen der analytischen Polyacrylamidgele erfolgte im Photometer Acta III der Fa. Beckman, Fullerton, USA.

Bei der Durchführung von Säulenchromatographie, präparativer Elektrophorese und präparativer Elektrofocussierung wurde die Proteinabsorption bei 280 nm kontinuierlich registriert mit einem Durchflußphotometer mit Schreiber (UA 5) von ISCO, Lincoln, USA.

Die präparative Elektrophorese wurde in der UltraPhor-Apparatur von Colora Meßtechnik, Düsseldorf, durchgeführt.

Die präparative Elektrofocussierung erfolgte in einer 110-ml-Ampholinesäule von LKB, Bromma, Schweden.

Für die analytische isoelektrische Focussierung mit fertig bezogenen Gelen (LKB) wurde die Multiphor-Apparatur von LKB verwendet.

Ultrafiltration wurde mit Zellen und Membranen der Fa. Amicon, Witten, durchgeführt.

Zur gaschromatographischen Analyse wurde ein Gaschromatograph Modell 402 von Hewlett-Packard, Düsseldorf, benutzt.

Zur radiogaschromatographischen Produktanalyse wurde ein Hewlett-Packard-Gaschromatograph Modell 5750 verwendet.

Die Radioaktivitätszählung erfolgte im Packard Tricarb Modell 2430.

2.2. Analytische Methoden

2.2.1. Enzymbestimmungen

Acyl-CoA-Dehydrogenase (allgemeiner Test) (56)

0,2 mol BICIN-KOH/l, pH 8,0; 10^{-4} mol MB/l; $2,5 \times 10^{-4}$ mol INT/l; 10^{-4} mol Acyl-CoA-Ester/l; 0,15 % Triton X-100; bis zu 200 μ l Enzymlösung. Gesamtvolumen = 1 ml, 30°C, 492 nm; die Reaktion wurde mit Substrat gestartet.

Acyl-CoA-Dehydrogenase II (spezifischer Test)

Die Zusammensetzung war dieselbe wie im allgemeinen Acyl-CoA-Dehydrogenasetest. Gesamtvolumen = 1 ml, 30°C, 296 nm. Die Messung wurde wegen der hohen optischen Dichte der Lösung in Gegenwart der Elektronenakzeptoren in Quarzküvetten mit 0,5 cm Schichtdicke durchgeführt.

2-Enoyl-CoA-Hydratase (=Crotonase) (57)

0,05 mol Tris-HCl/l, pH 8,9; 10^{-3} mol NAD/l; 2 μ l = 4 μ g β -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase (Kristallsuspension Boehringer); 2×10^{-4} mol 2-Enoyl-CoA-Ester/l; Enzymlösung. Gesamtvolumen = 1 ml, 30°C, 340 nm.

Die Reaktion wurde mit Enzymlösung gestartet.

β -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase (58)

0,03 mol $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7\text{-H}_3\text{PO}_4$ /l, pH 7,3; $3,3 \times 10^{-3}$ mol NADH/l; $1,5 \times 10^{-3}$ mol; Acetoacetyl-N-Acetyl-Cysteamin/l; Enzymlösung. Gesamtvolumen = 3 ml, 25°C, 340 nm. Die Reaktion wurde mit Enzymlösung gestartet.

β -Ketoacyl-CoA-Thiolase (59)

0,1 mol Tris-HCl/l, pH 8,1; 5×10^{-5} mol Acetoacetyl-CoA/l; 2×10^{-2} mol MgCl_2 /l; 2×10^{-4} mol CoASH/l; Enzymlösung. Gesamtvolumen = 1 ml, 30°C, 303 nm. Die Reaktion wurde mit Enzymlösung gestartet.

4-Enoyl-CoA-Reduktase (29)

0,05 mol KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 /l, pH 7,4; 10^{-4} mol NADPH/l;
 2×10^{-4} mol Acyl-CoA-Ester/l; Enzymlösung. Gesamtvolumen
= 1,25 ml, 37°C , 340 nm. Die Reaktion wurde mit Substrat
gestartet.

2.2.2. Proteinbestimmungsmethoden

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Murphy und Kies (60):

Der Proteingehalt wurde aus der Differenz der Absorptionen bei
215 und 225 nm durch Vergleich mit einer Rinderserumalbumin-
Eichkurve ermittelt.

Für sehr stark verdünnte Lösungen wurde die Methode nach Heil
und Zillig verwendet (61):

Je 20 μl Proteinlösung wurde auf kleine Streifen Cellulose-
Acetat-Folie ($1,0 \times 0,5 \text{ cm}^2$) aufgetragen, an der Luft getrock-
net und mit einer Lösung von 2,4 g Amidoschwarz in 450 ml
Methanol und 100 ml Eisessig pro Liter 30 min gefärbt. Über-
schüssige Färbelösung wurde durch Entfärben mit 450 ml Metha-
nol und 100 ml Eisessig pro Liter entfernt. Die Cellulose-
Acetat-Streifen wurden in einer Meßlösung von 800 ml Eisessig,
100 ml Ameisensäure und 10 ml TCA pro Liter aufgelöst. Bei
600 nm wurde die Absorption der Proben gegen die Meßlösung
bestimmt. Der Proteingehalt wurde aus einer Rinderserumalbumin-
Eichkurve ermittelt.

Während des Reinigungsganges für die Acyl-CoA-Dehydrogenasen
wurde die Proteinauftrennung qualitativ verfolgt durch die
Messung der Absorption bei 280 nm in den einzelnen Fraktionen
oder durch die kontinuierliche Registrierung der Absorption
bei 280 nm mit Hilfe eines Durchflußphotometers.

2.2.3. Analytische Polyacrylamidgelelektrophoresen

Die Gelelektrophoresen zur Untersuchung nativer Proteine wurden in Glasröhrchen mit einem Innendurchmesser von 6 mm durchgeführt. Es wurde 7 cm hoch Trenngel und 1,3 cm hoch Sammelgel eingefüllt und bis zu 200 μ l Probenvolumen aufgetragen. Die Proben waren mit Glycerin beschwert und mit Bromphenolblau als Marker versetzt. Zur Elektrophorese wurde bei Raumtemperatur eine konstante Stromstärke von 2 mA pro Röhrchen während der Konzentrierung im Sammelgel und 5 mA pro Röhrchen während der Trennung verwendet. Die Laufzeit betrug ca. 3 Stunden. Die Proteine wurden mit Amidoschwarz-Lösung angefärbt (2,9 g Amidoschwarz, 100 ml Methanol und 27 ml Eisessig pro Liter). Die Entfärbung des Untergrundes wurde mit einer Lösung von 125 ml Isopropanol und 125 ml Eisessig pro Liter bei 20 - 40°C erreicht.

2.2.3.1. System Maurer 1(62,63)

Elektrodenpuffer: 30 g Glycin/l, 6,2 g Tris/l; Trenngelpuffer: 366 g Tris/l, 2,3 ml TEMED/l, mit HCl auf pH 8,9 eingestellt; Sammelgelpuffer: 57 g Tris/l, 4,6 ml TEMED/l, mit H_3PO_4 auf pH 6,9 eingestellt

Acrylamidmonomerenlösungen: Trenngel: 300 g Acrylamid/l, 8,0 g N,N-Methylenbisacrylamid/l; Sammelgel: 100 g Acrylamid/l, 25 g N,N-Methylenbisacrylamid/l
2,8 g Ammoniumpersulfat/l

Gegenkammerpuffer: 45 g Tris/l, mit HCl auf pH 8,1 eingestellt
Elutionspuffer: Gegenkammerpuffer 1:3 verdünnt

Zur Anfertigung von Gelen wurden folgende Mischungen hergestellt:

Lösungen	Trenngel	Sammelgel
Gelpuffer	4 ml	1 ml
Acrylamidmonomere	8 ml (7,5%)	2 ml (2,5%)
H ₂ O	12 ml	3 ml
TEMED	-	5 µl
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	8 ml	2 ml
	32 ml	8 ml

2.2.3.2. System Maurer 6 (63,64)

Elektrodenpuffer: 5,52 g 5,5-Diäthylbarbitursäure/l, 1,0 g Tris/l, pH 7,0; Trenngelpuffer: 68,5 Tris/l, 4,6 ml TEMED/l, mit HCl auf pH 7,5 eingestellt; Sammelgelpuffer: 49,5 g Tris/l, 4,6 ml TEMED/l, mit H₃PO₄ auf pH 5,5 eingestellt
Gegenkammerpuffer: 8,42 g Tris/l, mit HCl auf pH 6,7 eingestellt,
Elutionspuffer: Gegenkammerpuffer 1:3 verdünnt

Die Persulfatlösung und die Acrylamidmonomerenlösungen sowie die Gelmischungen waren dieselben, wie für das System Maurer 1 (s.o.).

Spezifische Anfärbung der Acyl-CoA-Dehydrogenasen:

Die Gele wurden 15 Minuten in H₂O gewässert. Dann wurden sie bei Raumtemperatur im Dunkeln mit Färbelösung inkubiert (2 x 10⁻⁴ mol MB/l, 5 x 10⁻⁴ mol INT/l, 10⁻⁴ mol Acyl-CoA/l, 0,2 mol BICIN-KOH/l, pH 8,0 + 0,15 % Triton X-100). Nach dem Erscheinen der Formazanbanden wurden die Gele in BICIN-Puffer überführt. Der Puffer wurde mehrmals gewechselt, bis der Hintergrund entfärbt war.

2.2.3.3. Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen (SDS-Elektrophorese)

Es wurde das Slabgel-System nach Lämmli (65) benutzt. Die Gele enthielten 10 % Acrylamid im Trenngel, die Gelkammer maß $0,2 \times 10 \times 13 \text{ cm}^3$.

Elektrodenpuffer: 6 g Tris-HCl/l, 28,8 g Glycin/l, 1,0 g SDS/l;
Trenngelpuffer: 181,7 g Tris/l, mit HCl auf pH 8,8 eingestellt;
Sammelpuffer: 60,6 g Tris/l, mit HCl auf pH 6,8 eingestellt;
Acrylamidmonomerenlösung: 200 g Acrylamid und 5,33 g N,N-Methylenbisacrylamid pro Liter; Ammoniumpersulfat: 100 g/l;
SDS: 200 g/l. Probenpuffer: 100 ml Glycerin, 50 ml β -Mercapto-
äthanol, 30 g SDS, 125 ml Sammelpuffer und 2 g Bromphenol-
blau pro Liter.

Die Proben wurden mit einem gleich großen Volumen Probenpuffer versetzt und 15 min im siedenden Wasserbad denaturiert.

Gelmischungen:

Lösungen	Anzahl ml für	
	Trenngel	Sammegel
Acrylamidmonomerenlösung	15,0	2,0
Puffer	7,5	2,0
H ₂ O	7,05	3,8
SDS-Lösung	0,225	0,12
Persulfatlösung	0,2	0,08
TEMED	0,02	0,008

Die Elektrophorese wurde bei Raumtemperatur mit einer konstanten Stromstärke von 20 mA durchgeführt. Zum Färben und Entfärben wurden folgende Lösungen verwendet: Färbelösung: 2,5 g Coomassie Brilliant Blue R 250, 455 ml Methanol und 90 ml Eisessig pro Liter, Entfärbelösung: 300 ml Methanol und 75 ml Eisessig pro Liter.

2.2.3.4. Gelelektrophorese nativer Proteine im Polyacrylamid-Dichtegradienten

Gradientengele der Firma Pharmacia, Upsala, Schweden, mit einem Polyacrylamid-Dichtegradienten von 4 bis 30 % (Trennbereich 5×10^4 bis 2×10^6 Dalton laut Hersteller) wurden in der im Labor gebräuchlichen Slabgel-Apparatur verwendet. Die Glasplatten, zwischen die das Gradientengel eingegossen ist, stehen oben ca. 5 mm über das Gel über. Hier wurde ein Taschengel eingefüllt und mit einem Taschenformer 6 Taschen mit je 80 μ l Volumen hergestellt.

Taschengel: Acrylamidmonomerenlösung: 300 g Acrylamid/l, 8 g N,N-Methylenbisacrylamid/l; Pufferlösung: 1 g H_3BO_3 /l, 1 g $EDTA \cdot Na_2$ /l; Ammoniumpersulfat: 0,7 mg/ml Gel. Zur Herstellung eines 10 %igen Gels wurden ein Teil Acrylamidmonomerenlösung und zwei Teile Puffer gemischt. Elektrodenpuffer: 0,09 Mol Tris-HCl/l = 10,91 g/l, 0,08 Mol H_3BO_3 /l = 4,94 g/l und 0,93 g $EDTA \cdot Na_2$ /l. Der pH-Wert betrug 8,4. Das Elektrophoresesystem wurde 15 min bei 125 V voräquilibriert.

Vorbereitung der Proben: Die Proben wurden mit Glycerin und Bromphenolblau versetzt und in die Taschen eingefüllt. Eine Spannung von 70 V wurde eingestellt, bis die Proben in das Gel eingewandert waren. Dann wurde 15 Stunden bei 150 V gearbeitet (= 2250 Vxh). Zum Färben und Entfärben wurde dasselbe System verwendet wie für die SDS-Gele (vgl. Kap. 2.2.3.3., S. 16).

2.2.4 Isoelektrische Focussierungen

2.2.4.1. Analytische Elektrofocussierung (pH 3,5 - 9,5)

Es wurde eine Multiphor-Apparatur von LKB, Bromma, Schweden, benutzt. Die Gele mit einem pH-Gradienten von 3,5 bis 9,5 wurden von LKB fertig bezogen (Ampholine PAGplates T = 5 %, C = 3 %, Ampholytkonzentration = 2,4 % w/v). Die Proben wur-

den salzfrei dialysiert gegen eine Lösung von 0,1 mol Glycin/l und 0,15 % Triton X-100. Es wurde dreimal gegen das 50fache Volumen dialysiert. Die Focussierung und die Anfärbung der Proteine wurde nach LKB-Vorschrift durchgeführt. Teile des Gels wurden für eine spezifische Anfärbung der Acyl-CoA-Dehydrogenasen abgeschnitten, dreimal 15 min gewässert, um die Ampholyte herauszuwaschen und dann mit den entsprechenden Färbelösungen für die Acyl-CoA-Dehydrogenasen behandelt (vgl. Kap. 2.2.3.2., S. 15).

2.2.4.2. Analytische Elektrofocussierung (pH 4-7) zur Bestimmung der isoelektrischen Punkte

Die isoelektrische Focussierung wurde in einer Slabgel-Elektrophoreseapparatur durchgeführt. Die Gelkammer maß 0,27 x 8 x 8 cm³. Das Gel enthielt 5 % Acrylamid und je 1 % Ampholyte pH 4 - 6 und pH 5 - 7.

Gelmischung: 5 ml Acrylamidmonomerenlösung (200 g Acrylamid und 6 g N,N-Methylenbisacrylamid pro l), 0,5 ml Servalyt pH 4 - 6, 0,5 ml Servalyt pH 5 - 7. 14 ml Ammoniumpersulfatlösung (715 mg/l $\hat{=}$ 10 mg/14 ml), 12 μ l TEMED. Mit einem Taschenformer wurden 0,5 cm tiefe Taschen hergestellt. Im Mittelteil des Gels wurde eine Tasche nicht mit Substanz beladen. Aus diesem Teil wurde der pH-Gradient bestimmt.

Als Elektrodenlösungen wurden benutzt (66): Kathode (obere Elektrode) 10 mmol Histidin/l (IP = 7,58) und Anode (untere Elektrode) 10 mmol Glutaminsäure/l (IP = 3,22).

Die Proteinproben wurden mit Glycerin/Bromphenolblau beschriftet. Es wurde 15 Stunden bei 300 V focussiert.

Die Färbung des Proteins und die Entfärbung des Gels wurde nach Vesterberg et al., Methode A, durchgeführt (67). Färbelösung: 9 g Sulfosalicylsäure + 30 g Trichloressigsäure in 186 ml H₂O lösen; 250 mg Coomassie Brilliant Blue R 250 in 75 ml Methanol lösen; die Lösungen vereinigen, auf 60°C erhitzen und das Gel für 60 min darin färben. Die Färbelösung

ist 7 Tage haltbar.

Entfärbelösung: 100 ml Essigsäureäthylester, 50 ml Eisessig und 70 ml Äthanol pro Liter. Entfärbelösung mehrmals wechseln, bis der Hintergrund entfärbt ist.

Bestimmung des pH-Gradienten

Unter der nicht beladenen Geltasche wurde ein ca. 1 cm breiter Streifen senkrecht aus dem Gel herausgeschnitten. Er wurde in vierzehn 0,5 cm breite Stücke aufgeteilt. Diese Abschnitte wurden in kleinen Plastikgefäßen mit je 0,4 ml H_2O ca. eine Stunde stehengelassen. Dann wurden die pH-Werte bestimmt.

2.3. Entwicklung eines Enzymtests für Acyl-CoA-Dehydrogenasen

Lösungen zur Untersuchung geeigneter Bestimmungsmethoden:

Puffer: Phosphatpuffer (0,2 mol/l): 27,22 g KH_2PO_4 /l + 0,15 %

Triton X-100, mit NaOH eingestellt

Trispuffer (0,2 mol/l): 24,23 g Tris/l + 0,15 %

Triton X-100, mit HCl eingestellt

Glycylglycinpuffer (0,2 mol/l): 26,42 g Glycylglycin/l + 0,15 % Triton X-100, mit KOH eingestellt

BICIN-Puffer (0,2 mol/l): 32,63 g N,N-Bis(2-hydroxy-äthyl)glycin/l + 0 - 0,5 % Triton X-100, mit KOH eingestellt

primäre Elektronenakzeptoren:

PMS (10^{-2} mol/l): 3,06 g Phenazinmetholsulfat/l H_2O

MB (2×10^{-3} mol/l): 550 mg 7-Dimethylamino-1,2-benzophenoxazin (=Meldolablauf) pro Liter H_2O

sekundäre Elektronenakzeptoren:

DCI (5×10^{-3} mol/l): 1,84 g 2,6 Dichlorphenolindo-phenol pro Liter Tris-HCl-Puffer (0,05 mol/l), pH 7,5

INT (5×10^{-3} mol/l): 2,61 g Jodnitrotetrazoliumchlorid/l H_2O

Variationen in pH-Werten, Temperaturen, Konzentrationen usw. sind im Text angegeben.

2.4. Darstellung von Ausgangsmaterial

2.4.1. Darstellung von Rinderlebermitochondrien nach Brosnan et al. (68)

Rinderleber wurde schlachtfrisch vom Schlachthof geholt. Nach Entfernung von Haut, Sehnen, Fett und großen Gefäßen wurde die Leber in Würfel geschnitten und im Fleischwolf zerkleinert. Zur Aufarbeitung wurden 10 kg Leberbrei eingesetzt. Folgender Puffer wurde verwendet: 40,08 g Mannit/l, 23,96 g Saccharose/l ($\hat{=}$ 0,25 mol/l), 0,467 g HEPES/l (HEPES = 2-[4-(2-Hydroxyäthyl)-piperazinyl-(1)]äthansulfonsäure), mit KOH auf pH 7,2 eingestellt.

Je 400 g Leberbrei wurden mit 1200 ml Puffer im Starmix 30 s homogenisiert (Rohhomogenat). Bei 800xg wurden restliche Gewebepartikel, ganze Zellen, Zelltrümmer und Zellkerne abgetrennt. Die im Überstand vorhandenen Mitochondrien wurden bei 8000xg sedimentiert und zweimal mit Mitochondrienpuffer gewaschen.

2.4.2. Darstellung von Acetontrockenpulver aus Rinderlebermitochondrien nach Dahlen und Porter (69)

Eine Acetonmischung wurde hergestellt aus 18 l dest. Aceton, 1,0 l dest. H_2O und 24 ml konz. NH_3 -Lösung. (NH_3 wird zugesetzt, um membranassoziierte Proteine in Lösung zu bringen). Die Acetonmischung wurde auf $-15^{\circ}C$ gekühlt. Unter heftigem Rühren wurde das Mitochondriensediment zugetropft (1 l pro 10 l Acetonmischung). Es wurde eine Stunde nachgerührt. Die Temperatur wurde auf $-15^{\circ}C$ gehalten. Dann wurde bei $-15^{\circ}C$ abzentrifugiert und das Sediment einmal mit Acetonmischung und

einmal mit destilliertem Aceton bei -15°C gewaschen. Das Sediment wurde bei 4°C im Ölpumpenvakuum getrocknet. Es wurde ein fester Kuchen erhalten, aus dem durch Mörsern und Sieben ein feines Pulver hergestellt wurde. Es wurde bei -18°C gelagert.

2.4.3. Trockenpulverextraktion

Zur Extraktion des Acetontrockenpulvers wurden pro Gramm 20 ml Puffer zugegeben. Es wurde eine Stunde bei 4°C gerührt und 30 Minuten bei 100.000xg abzentrifugiert.

Zur Gewinnung konzentrierter Rohextrakte wurde die Puffermenge pro Gramm Trockenpulver bis auf 5 ml verringert. Dadurch sank die Proteinausbeute um ca. 10 %.

Extrakte wurden zu verschiedenen Zwecken mit verschiedenen Puffern hergestellt.

2.4.4. Bestimmungen von Acyl-CoA-Dehydrogenaseaktivitäten in frischer Rinderleber

Frieren - Tauen

Während der differentiellen Zentrifugation (Kap . 2.4.1., S. 20) erhaltene Proben des 800xg-Überstandes und des 8000xg-Sediments wurden über Nacht im Tiefkühlschrank gelagert (-18°C). Nach dem Auftauen wurde mit zwei Teilen Tris-HCl-Puffer ($0,05 \text{ mol/l} + 10^{-5} \text{ mol FAD/l} + 5 \times 10^{-4} \text{ mol EDTA/l} + 5 \times 10^{-4} \text{ mol DTE/l}$, pH 7,5) verdünnt und 45 Minuten bei 100.000xg abzentrifugiert.

Osmotischer Schock

Entsprechende Proben wurden über Nacht dialysiert gegen Tris-HCl-Puffer ($0,05 \text{ mol/l} + 10^{-5} \text{ mol FAD/l} + 5 \times 10^{-4} \text{ mol EDTA/l}$), der zusätzlich $0,25 \text{ mol Saccharose/l}$ enthielt. Zum Test wurden diese Proben mit zwei Teilen Dialysepuffer verdünnt und direkt eingesetzt.

Triton X-100-Behandlung (70)

Die Proben wurden wie oben dialysiert. Das Dialysat wurde mit zwei Teilen Dialysepuffer verdünnt. Von einer Lösung von 10 % Triton X-100, 10^{-5} mol FAD/l, 5×10^{-4} mol EDTA/l und 0,05 mol Tris-HCl/l, (pH 7,5), wurden zum Dialysat 0,11 Teile zugesetzt. Es wurde 15 Minuten bei 90.000xg abzentrifugiert.

2.5. Austestung von Reinigungsmethoden

2.5.1. Ammoniumsulfatfällungen

A Fällung mit festem Ammoniumsulfat

Die Fällungen wurden unter Eiskühlung und pH-Kontrolle durchgeführt. Zum Rohextrakt wurde portionsweise festes Ammoniumsulfat zugegeben und unter starkem Rühren gelöst. Die erforderlichen Mengen wurden nach folgender Formel berechnet:

$$g(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/\text{ml} = \frac{1,77 \times \text{Sättigungszunahme}}{3,42 \times \text{Sättigungsendwert}}$$

Nach Zusatz der gewünschten Menge wurde 30 min nachgerührt und 10 min bei 12.000xg abzentrifugiert (Sorvall RC 2-B).

Die Fraktionierung wurde durchgeführt wie bei Beinert beschrieben (43): 0 - 45 % = 0,268 g/ml; 45 - 55 % = 0,062 g/ml; 55 - 65 % = 0,064 g/ml; 65 - 80 % = 0,101 g/ml. Die Sedimente wurden in Tris-HCl (0,05mol/l, pH 7,5) aufgelöst.

B Fällung mit Ammoniumsulfatlösung (71)

Der Rohextrakt wurde in 0,05mol Tris-HCl/l, pH 7,5 + 10^{-5} mol FAD/l und 5×10^{-4} mol EDTA/l hergestellt. Dem Rohextrakt wurden 5×10^{-4} mol DTE/l zugesetzt. In 0,05mol Tris-HCl/l wurden 10^{-5} mol FAD/l, 5×10^{-4} mol EDTA/l, 5×10^{-4} mol DTE/l und 3,8 mol $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /l (682 g/l) zugesetzt. Von dieser Lösung wurden bei 0°C unter starkem Rühren zum Rohextrakt zugegeben:

0 - 1,6 mol $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /l (0-40 %) = 709 ml/l; 1,6 - 2,8 mol $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /l (40 - 70%) = 1179 ml/l. Es wurde 30 min nachgerührt und 20 min bei 15.000xg abzentrifugiert (Sorvall RC 2-B). Das 0 - 40 %-Sediment wurde verworfen.

2.5.2. Adsorption an Alumina C_γ

Die Methode wurde der Reinigungsvorschrift für Butyryl-CoA-Dehydrogenase aus Rinderleber von Green entnommen (8). Alumina C_γ (frisch gefälltes $Al(OH)_3$) nach Willstätter und Kraut (72) wurde als Suspension gekauft. Das Gel wurde abgenutscht und mit Puffer gewaschen ($0,05 \text{ mol Tris-HCl/l} + 10^{-5} \text{ mol FAD/l} + 5 \times 10^{-4} \text{ mol EDTA/l} + 5 \times 10^{-4} \text{ mol DTE/l}$, pH 7,5). Der Rohextrakt wurde im selben Puffer hergestellt. Pro 50 mg Protein wurde 1 g Alumina C_γ (Feuchtgewicht) zugesetzt. Es wurde gut durchgemischt und nach 30 min abzentrifugiert (Tischzentrifuge). Die Elution der Acyl-CoA-Dehydrogenasen erfolgte mit Tris-Puffer (wie oben) + $1,6 \text{ mol } (NH_4)_2SO_4/l$ (= 40 % Sättigung). Mit dieser Lösung wurde zweimal gewaschen. In den vereinigten Eluaten wurde mit Puffer + $3,8 \text{ mol } (NH_4)_2SO_4/l$ die Acyl-CoA-Dehydrogenasen wieder ausgefällt. ($2616 \text{ ml/l} = 80 \text{ \% Sättigung}$).

2.5.3. Adsorption an DEAE-Sephadex und DEAE-Cellulose

A Batch-Verfahren

DEAE-Sephadex A-50 wurde in $0,05 \text{ mol Tris-HCl/l}$, pH 7,5 gequollen. DEAE-Cellulose (DE 52 von Whatman) wurde im gleichen Puffer äquilibriert. Die Gele wurden abgenutscht. Aus 50 mg Acetontrockenpulver pro ml Puffer (s.o.) wurde ein Rohextrakt hergestellt. Je 2 ml Rohextrakt wurden zu 1 g abgenutschem Gel zugegeben und unter mehrmaligem Umschütteln 30 min äquilibriert. Dann wurde abgenutscht und mit dem gleichen Volumen des gleichen Puffers nachgespült. Um vollständige Elution nicht gebundenen Proteins zu erreichen, wurde nochmals mit dem gleichen Puffer 30 min inkubiert, abgenutscht und nachgewaschen. Die Desorption der Acyl-CoA-Dehydrogenasen wurde mit steigenden Mengen an NaCl durchgeführt: $0,05$; $0,1$; $0,15$ und $0,2 \text{ mol/l}$. Es wurde mit 2 ml Puffer pro Gel 30 min inkubiert, abgenutscht und nachgespült.

B Säulenchromatographie

Zur Chromatographie wurden Säulen mit 1 cm Durchmesser und 4,3 cm Höhe benutzt. Die DEAE-Sephadex A-50-Säule wurde mit Puffer + 0,1 mol NaCl/l äquilibriert, die DE 52-Säule mit Puffer + 0,05 mol NaCl/l. Den Rohextrakten wurden entsprechende Mengen NaCl zugesetzt. Die Säulen wurden mit bis zu 50 mg Protein (ca. 4 ml Rohextrakt) beladen und mit Puffern derselben NaCl-Molarität gespült, bis kein Protein mehr eluiert wurde (LKB-Perpex-Pumpe, 30 ml/h). Die Acyl-CoA-Dehydrogenasen wurden mit einem linearen kontinuierlichen NaCl-Gradienten bis 0,5 mol NaCl/l Puffer eluiert.

Die Ionenaustauschchromatographie in DE 52-Säulen wurde im Laufe der Arbeit durch die Verwendung und Optimierung diskontinuierlicher NaCl-Gradienten erheblich verbessert. Die Bedingungen für die Chromatographie an DE 52, die für die Enzymreinigung verwendet wurden, sind in Kap. 2.6., S. 27 beschrieben.

2.5.4. Gelchromatographie an Sephadex G-150 und Sephadex G-200

A Packen von Sephadex-Säulen

Sephadex G-150 und G-200 wurden mit dem 1,5-Fachen des gewünschten Volumens an Tris-HCl-Puffer (0,05 mol/l, pH 7,5) im siedenden Wasserbad fünf Stunden lang gequollen. Die Chromatographiesäule wurde im Kühlraum montiert, unten verschlossen und mit einem Einfülltrichter incl. Vorratsgefäß versehen. Das Gel wurde nach Abkühlen auf ca. 30°C in die Säule eingefüllt und ca. 24 Stunden absitzengelassen. Dann wurde der Säulenauslauf geöffnet und der Ablaufschlauch so montiert, daß eine Druckdifferenz von ungefähr 20 cm Wassersäule entstand. Am folgenden Tag wurde die Säule oben mit einem Adaptor verschlossen und an eine peristaltische Pumpe angeschlossen. Die Pumpgeschwindigkeit wurde gleich der für den späteren Betrieb der Säule vorgesehenen Geschwindigkeit

gewählt. Nach einem weiteren Tag wurde der Adaptor nachgerichtet und die Durchflußrichtung der Säule umgekehrt. Es wurde aufsteigend chromatographiert.

B Untersuchungen mit Sephadex G-150

Zum Austesten dieses Materials wurden Säulen von 1,6 cm Durchmesser und 90 cm Höhe verwendet. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 8 ml/h.

Zur Reinigung größerer Proteinmengen (bis 7,5 g Protein) wurden Säulen von 10 cm Durchmesser und 85 cm Höhe benutzt. In diesen Säulen wurde absteigend chromatographiert. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug ca. 150 ml/h.

C Untersuchungen mit Sephadex G-200

Zur Nachreinigung von enzymhaltigen Randfraktionen, die nach präparativer Elektrophorese erhalten wurden, wurden Sephadex G-200-Säulen von 100 cm Höhe und 1,6 oder 2,6 cm Durchmesser verwendet. Die Elution erfolgte mit 8 bzw. 16 ml/h. Zum Schutz der Acyl-CoA-Dehydrogenasen wurde mit Puffer + 10^{-5} mol FAD/l äquilibriert und eluiert.

2.5.5. Präparative Elektrophorese

Zur präparativen Elektrophorese wurde das Gerät UltraPhor von Colora Meßtechnik verwendet. Die benutzte Trennkammer hatte eine Schichtdicke von 7,5 mm. Das Gelsystem Maurer 6 ist in Kap. 2.2.3.2., S. 15, beschrieben. Das Gel wurde aus 40 ml Trenngel (= 4 cm Höhe) und 10 ml Sammelgel (= 1 cm Höhe) hergestellt. Die Gegenkammer wurde mit 16 ml Gegenkammerpuffer pro Stunde gespült. Es wurde mit 60 ml Elutionspuffer pro Stunde eluiert. Die aufzutrennende Proteinfraktion wurde konzentriert auf ca. 15 ml und dreimal gegen das zehnfache Volumen Sammelgelpuffer (pH 5,5) dialysiert. (Der Sammelgelpuffer war 1:8 verdünnt entsprechend der im Sammelgel vorliegenden Konzentration.) Nach der Dialyse wurde bei

100.000xg abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf 3-4 ml eingengt (Ultrafiltration durch Amicon XM 100), mit Glycerin und Bromphenolblau versetzt und mit einer peristaltischen Pumpe durch Unterschichten des Elektrodenpuffers auf die Geloberfläche aufgepumpt. Die Lösung verteilte sich aufgrund ihrer größeren Dichte selbständig gleichmäßig über die gesamte Oberfläche. Die Elektrophorese wurde spannungskonstant bei 400 V durchgeführt. Nach ca. drei Stunden erschien das Bromphenolblau im Eluat.

2.5.6. Präparative isoelektrische Focussierung

In der präparativen Elektrofocussierung wurde die Proteinverteilung durch Messen der optischen Dichte bei 280 nm festgestellt. Triton X-100, das der Dialyse für die analytische Elektrofocussierung zugesetzt wurde, stört diese Messungen jedoch. Es wurde daher für das präparative Verfahren durch Tween 80 ersetzt.

Die präparative isoelektrische Focussierung wurde in einer kleinen Ampholinesäule von LKB (110 ml) durchgeführt. Zur Herstellung des pH-Gradienten wurden gleiche Teile von Ampholyt-lösungen pH 4 - 6 und pH 5 - 7 verwendet (Servalyt, je 2,5 ml 40 %ige Lösungen, bei 100 ml Gesamtvolumen = je 1 %).

Der Dichtegradient (0 - 60 % Saccharose) wurde nach LKB-Vorschrift diskontinuierlich aus 22 Fraktionen à 4,2 ml hergestellt. Die Probe (bis 5 ml Volumen) wurde in den Fraktionen 16 - 18 entsprechend einem zu erwartenden pH-Wert zwischen 6,0 und 6,5 zugemischt.

Als Elektrodenlösungen wurden benutzt: Anode (untere Elektrode): 1 %ige H_3PO_4 + 60 % Saccharose; Kathode (obere Elektrode): 1 %ige NaOH. Die Focussierung wurde bei +2 bis +4°C durchgeführt. Dazu wurde die Ampholinesäule mit einem Kryostaten temperiert.

Die Focussierung wurde bei konstanter Spannung durchgeführt. Es wurde mit 450 V gestartet und nach 30 min auf 600 V er-

hört. Es wurden Focussierungszeiten von 16 bis 66 Stunden verwendet. Nach beendeter Focussierung wurde der Säuleninhalt abgepumpt und fraktioniert (2-ml-Fractionen). Die optische Dichte der Lösung bei 280 nm wurde kontinuierliche registriert.

2.6. Gewinnung von gereinigten Acyl-CoA-Dehydrogenasen

1. Rohextrakt

Zur Trockenpulverextraktion wurde 0,05 mol Tris-HCl/l, pH 7,5 mit 10^{-5} mol FAD/l und 5×10^{-4} mol EDTA/l verwendet. Pro Gramm Trockenpulver wurden 5 ml Puffer eingesetzt. Die Extraktionsbedingungen sind in Kap. 2.4.3., S. 21, beschrieben. Dem Rohextrakt wurden 5×10^{-4} mol DTE/l zugesetzt.

2. Ammoniumsulfatfällung

Das 40 - 70%-Sediment wurde durch Fällern mit Ammoniumsulfatlösung hergestellt wie in Kap. 2.5.1., S. 22, unter B beschrieben. Es wurde in einem kleinen Volumen Tris-HCl (0,05 mol/l, pH 7,5) aufgeschlämmt und diese Suspension gegen denselben Puffer dialysiert, bis eine klare Lösung entstanden war.

3. Gelfiltration

Das aufgelöste 40 - 70%-Sediment wurde auf eine Sephadex G-150-Säule (10 cm Durchmesser x 85 cm Höhe) aufgetragen. Herstellung und Beladen der Säule sind auf S. 24 beschrieben. Die Säule wurde mit 0,05 mol Tris-HCl/l pH 7,5 eluiert (150 ml/h). Es wurden Fraktionen von 27 ml aufgefangen. Die Fraktionen mit Acyl-CoA-Dehydrogenaseaktivität wurden zum G-150-Pool vereinigt.

4. Ionenaustauschchromatographie

Eine Säule von 2,6 cm Durchmesser und 12 cm Höhe wurde mit DE 52 in 0,05 mol Tris-HCl/l pH 7,5 + 0,03 mol NaCl/l hergestellt. Dem G-150-Pool wurden 0,03 mol NaCl/l zugesetzt. Der

G-150-Pool wurde aufgepumpt (210 ml/h). Dann wurde mit Puffer + 0,03 mol NaCl/l gespült, bis kein Protein mehr eluiert wurde (210 ml/h). Der Durchlauf wurde verworfen. Die Elutionen (105 ml/h) erfolgten mit 0,055 mol NaCl/l (1300 ml), 0,06 mol NaCl/l (335 ml), 0,09 mol NaCl/l (820 ml), 0,105 mol NaCl/l (335 ml) und 0,16 mol NaCl/l (1325 ml). Die Elutionsbedingungen sind in Tabelle 6, S. 74 zusammengestellt. Den Acyl-CoA-Dehydrogenasefraktionen (DH I: 0,055 mol NaCl/l; DH II: 0,09 mol NaCl/l; DH III: 0,16 mol NaCl/l) wurde 10^{-5} mol FAD/l zugesetzt. Sie wurden durch Ultrafiltration (Amicon Filtermembran XM-100) auf 10 bis 15 ml konzentriert.

5. Präparative Elektrophorese

Die präparative Elektrophorese wurde durchgeführt, wie in Kap. 2.5.5., S. 25, beschrieben. Dem Gelpuffer und den Elutionspuffern wurde 10^{-5} mol FAD/l und 5×10^{-4} mol EDTA/l zugegeben. Die DH II wurde mit einem kontinuierlichen linearen Saccharosegradienten (0 - 20 %) eluiert. Die Fraktionierung der Eluate erfolgte direkt in Schraubgläschen (ca. 5 ml/Fraktion). Die Fraktionen wurden nicht vereinigt oder konzentriert, sondern sofort eingefroren.

2.7. Herstellung der Substrate

Die gesättigten Fettsäuren (C_4 bis C_{24}), 4-Pentensäure und radioaktiv markierte [$1-^{14}C$]-Decansäure wurden gekauft. Die ungesättigten Fettsäuren wurden von W.-H. Kunau durch chemische Totalsynthese hergestellt (73) und standen als Monoin- und Polyinsäuren zur Verfügung. Sie wurden durch stereospezifische Hydrierung in die cis-Monoen- und all-cis-Polyensäuren überführt.

2.7.1. Hydrierung der Monoin- und Polyinsäuren

0,6 g Lindlar-Katalysator (74) und 1 ml dest. Chinolin wurden zu 560 ml Essigsäuremethylester zugesetzt und 2 Stunden

unter Schütteln mit H_2 gesättigt. 1 g der Monoin- oder Polyinsäure wurde in 100 ml dieser Lösung aufgenommen und 100 mg Katalysator zugesetzt. Dann wurde in H_2 -Atmosphäre geschüttelt. Die H_2 -Aufnahme wurde durch eine Gasbürette kontrolliert. Radioaktive $[4,5-^3H]-4c-10:1$ -Säure wurde durch Tritiierung aus 4-Decinsäure in einem analogen Verfahren dargestellt. Zur Überführung des Tritiums in das Reaktionsgefäß wurde in einer Vakuumapparatur nach Wenzel et al. gearbeitet (75).

2.7.2. Isolierung der Hydrierungsprodukte unter gleichzeitiger Überführung in die Methylester

Nach der Hydrierung wurde über eine Glasfritte abgenutscht und das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer entfernt. Die Säure wurde mit 10 %iger methanolischer HCl verestert, in 20 ml H_2O aufgenommen und fünfmal mit Petroläther extrahiert. Die vereinigten Petrolätherphasen wurden mit gesättigter $NaHCO_3$ -Lösung neutralgewaschen und mit Na_2SO_4 getrocknet. Nach einer Stunde wurde abfiltriert und am Rotationsverdampfer eingengt. Die Überführung in die Methylester war notwendig, weil die anschließende Reinigung durch Silbernitrat-Chromatographie an freien Säuren nicht durchführbar ist. Die Methylester wurden gaschromatographisch darauf überprüft, ob sie frei von partiell hydrierten Enin-Verbindungen waren. Solche Verunreinigungen können durch Silbernitrat-Chromatographie nicht abgetrennt werden.

2.7.3. Reinigung der cis-Monoen- und all-cis-Polyensäuremethylester durch Silbernitrat-Chromatographie

70 g Kieselgel H nach Stahl wurden in eine Lösung von 22 g $AgNO_3$ in 170 ml H_2O eingeührt. Glasplatten von $20 \times 20 \text{ cm}^2$ wurden 0,5 mm dick damit beschichtet. Die Platten wurden im

Dunkeln an der Luft getrocknet und bei 120°C eine Stunde aktiviert. Als Laufmittel wurde für Monoen- und Diensäuremethylester Benzol benutzt, für Polyensäuremethylester n-Heptan/Essigsäureäthylester/Aceton = 5:2:3. Durch Silbernitrat-Chromatographie werden ungesättigte Säuren nach der Anzahl der Doppelbindungen aufgetrennt. So konnten Hydrierungsprodukte, die durch Aufnahme von zuviel Wasserstoff Doppelbindungen verloren hatten, vom gewünschten Produkt abgetrennt werden. Nach der dünnenschichtchromatographischen Trennung wurde die Platte mit 2,7-Dichlorfluorescein (0,2 %ig in Äthanol) besprüht und die produkthaltige Zone unterm UV-Licht markiert. Diese Zone wurde ausgekratzt und zweimal mit trockenem frisch dest. Äther eluiert. Der Äther wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der gereinigte Methylester in Benzol aufgenommen. Die Substanz wurde gaschromatographisch auf ihre Reinheit überprüft.

2.7.4. Gaschromatographische Überprüfung der Fettsäuremethylester

Die gaschromatographische Reinheitskontrolle wurde mit einem Hewlett-Packard-Gaschromatographen Modell 402 mit Flammenionisationsdetektor durchgeführt. Die Säulenlänge betrug 1,8 m. Es wurde 15 % Diäthylenglycolsuccinat (DEGS) auf Chromosorb W-AW-DMCS 80 - 100 mesh als stationäre Phase verwendet. Die Temperatur betrug für Methylester der Kettenlänge C₁₀ 100°C isotherm, für 4,7,10,13-16:4-ME 160°C isotherm. Für 5,8,11,14-20:4-ME und 4,7,10,13-22:4-ME wurde eine Phase mit 6 % DEGS benutzt. Die Temperatur betrug 200°C.

2.7.5. Gewinnung der freien Fettsäuren

Die freien Fettsäuren wurden durch Verseifung mit methanolischer KOH dargestellt. Dazu wurden die Fettsäuremethylester mit methanolischer KOH (0,5 mol KOH/l CH₃OH) bei 80°C über

Nacht stehengelassen. Nach Ansäuern mit HCl wurden die freien Fettsäuren mit n-Hexan extrahiert.

2.7.6. Darstellung von Methylencyclopropylelessigsäure

Die Synthese der Methylencyclopropylelessigsäure wurde entsprechend der Vorschrift von Kean (76) durchgeführt. Die hierzu notwendige Ausgangssubstanz Hypoglycin A war ein Geschenk von Herrn Prof. C. von Holt (Kapstadt). Hypoglycin A wurde mit Ninhydrin-Reagenz zu Methylencyclopropylacetaldehyd umgesetzt (77). Die Oxidation erfolgte mit Tollen's Reagenz (78). Die freie Säure wurde durch Ionenaustausch an Dowex 50X8 hergestellt.

Die gaschromatographische Reinheitskontrolle wurde nach Veresterung einer Probe der Methylencyclopropylelessigsäure mit Diazomethan auf 15 % DEGS bei 100°C durchgeführt.

2.7.7. Darstellung der Acyl-CoA-Ester

Die Coenzym A-Ester wurden in einer leicht modifizierten Weise nach Goldman und Vagelos (79) dargestellt:

Die Fettsäure (325 µmol) wurde in THF durch Rühren bei Raumtemperatur für 60 min. mit äquimolaren Mengen von Chlorameisensäureäthylester und Triäthylamin in das gemischte Anhydrid überführt. Die Lösung wurde filtriert und zu einer wäßrigen Lösung von 65 µmol CoASH (mit NaOH auf pH 8,0 eingestellt) im Eisbad unter N₂ und unter pH-Kontrolle zugetropft. Es wurde nachgerührt (N₂, 0°C), bis keine freien SH-Gruppen mehr nachweisbar waren (s.u.). Dann wurde mit HCl auf pH 3,0 eingestellt. THF wurde im N₂-Strom abgeblasen. Gesättigte Acyl-CoA-Ester wurden gefriergetrocknet und dann einmal mit Aceton und dreimal mit Äther gewaschen. Ungesättigte Acyl-CoA-Ester wurden durch dreimaliges Ausschütteln mit Äther aus der Reaktionslösung extrahiert und dann gefriergetrocknet.

Die Acyl-CoA-Ester wurden nach Pullman (80) über cellulosebeschichtete Dünnschichtplatten (Avicel) von freiem CoASH und freier Säure getrennt (Laufmittel: n-Butanol/Eisessig/ $H_2O = 5:2:3$). Die CoA-Ester-Bande wurde ausgekratzt und die Substanz mit H_2O (bei längerkettigen Säuren $>C_{10}$ mit $H_2O/THF = 1:1$) eluiert. THF wurde durch Gefriertrocknen entfernt. Die Acyl-CoA-Ester wurden mit H_2O auf einen Gehalt von 10 mmol/l eingestellt. Der CoA-Estergehalt wurde durch Messung bei 260 nm bestimmt (Adeninbande, $\epsilon = 16400 \text{ l mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) oder nach Verseifung mit KOH durch Bestimmung der freien SH-Gruppen mit Ellmans Reagenz (81).

Acetoacetyl-CoA zur Thiolasebestimmung wurde von B. Groß nach Decker und Lynen (82,83) synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

2.7.8. Referenzsubstanzen für die Gaschromatographie

Die Referenzsubstanzen für die gaschromatographische Produktanalyse (3c-10:1-ME, 3t-10:1-ME, 2t-10:1-ME, 2t,4c-10:2-ME, 2t,4t-10:2-ME, 3-OH-10:0-ME, 3-Keto-10:0-ME) wurden von P. Dommes synthetisiert (84) und zur Verfügung gestellt.

3. Ergebnisse

3.1. Kontinuierliche photometrische Enzymbestimmung

Voraussetzung für eine erfolgreiche Reinigung war ein schneller kontinuierlicher photometrischer Enzymtest. Daher wurden verschiedene Substanzen auf ihre Verwendbarkeit als Elektronenakzeptoren überprüft.

3.1.1. Wahl des primären Elektronenakzeptors EA I

Der meist verwendete Akzeptor ist Phenazinmethosulfat (PMS). Es wurde die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der PMS-Konzentration bei zwei Proteinkonzentrationen c_1 und c_2 gemessen (c_2 war doppelt so groß gewählt wie c_1).

Wenn man anhand der Meßpunkte für c_1 und c_2 die Geraden $\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\max}}$ durch lineare Regression ermittelt,

erhält man weder denselben K_M -Wert noch ein verdoppeltes $V_{\max}$ (Abb. 5A und 5B). Dieses Verfahren ist jedoch für die Berechnung der Geraden im Lineweaver-Burk-Diagramm nur begrenzt verwendbar, da es für alle Meßpunkte denselben systematischen Fehler voraussetzt. Im Lineweaver-Burk-Diagramm ist dies jedoch nicht der Fall. Aber auch bei der graphischen Auswertung zeigt sich, daß kein gemeinsames K_M existiert, bei dem sich nach optischer Anpassung an die Meßwerte eine Verdoppelung des $V_{\max}$ ergibt (Abb. 5C und 5D).

Zur Überprüfung dieses Ergebnisses wurde eine andere Meßreihe durchgeführt (Tab. 2; Abb. 6): Es wurde für fünf Proteinkonzentrationen c_1 bis c_5 , die wie 1:2:3:4:5 gewählt waren, bei zwei PMS-Konzentrationen (10^{-3} mol/l und 5×10^{-3} mol/l) die Anfangsgeschwindigkeit bestimmt. Diese Geschwindigkeiten verhielten sich nicht wie 1:2:3:4:5 (Tab. 2, Spalte 3 und 4). Es gab zwei Möglichkeiten, diese Daten auszuwerten:

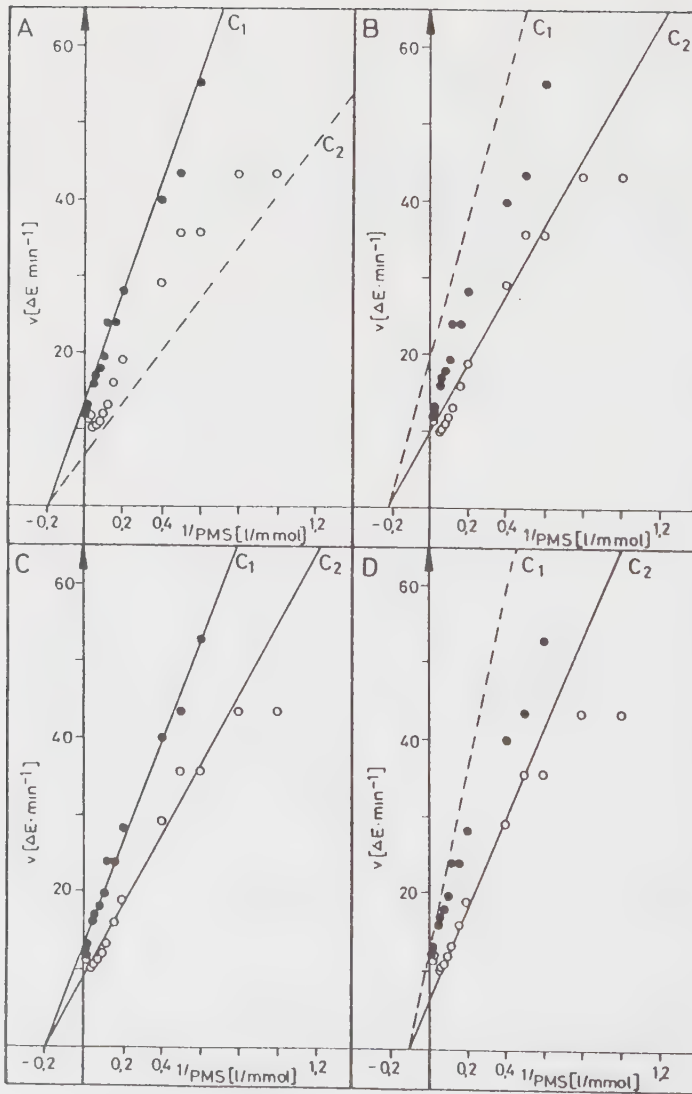


Abbildung 5

Abbildung 5: Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit der Acyl-CoA-Dehydrogenasereaktion von der Konzentration des primären Elektronenakzeptors Phenazinmethosulfat (PMS), bei zwei Substratkonzentrationen gemessen. Proteinmenge, 58 µg/ml; Substrat = 16:0-CoA, $c_1 = 10^{-4}$ mol/l (●—●), $c_2 = 5 \times 10^{-4}$ mol/l (○—○); INT, 5×10^{-4} mol/l; Glycylglycin-KOH (pH 8,2), 0,2 mol/l; Temperatur, 30°C. Versuche, das Lineweaver-Burk-Diagramm auszuwerten.

- A Der Verlauf der Geraden c_1 wurde durch lineare Regression berechnet (—), daraus wurde bei gleichem K_M und $V_{\max}(c_2) = 2 \times V_{\max}(c_1)$ die für c_2 erwartete Gerade ermittelt (---).
 - B Der Verlauf der Geraden c_2 wurde durch lineare Regression berechnet (—), daraus wurde bei gleichem K_M und $V_{\max}(c_1) = 1/2 \times V_{\max}(c_2)$ die für c_1 erwartete Gerade ermittelt (---).
 - C Aus den K_M -Werten in A und B wurde ein Mittelwert gebildet. Die Meßpunkte wurden durch optisch gut angepaßte Geraden mit diesem K_M -Wert verbunden.
 - D An die Meßpunkte bei der Substratkonzentration c_2 wurde die Gerade optisch gut angepaßt (—). Aus dem so erhaltenen K_M -Wert und dem $V_{\max}(c_1) = 1/2 V_{\max}(c_2)$ wurde die Steigung c_1 entnommen (---).
- a) Aus den beiden v-Werten wurden für jede Proteinkonzentration durch graphische Extrapolation nach Lineweaver-Burk $V_{\max}$ und K_M bestimmt. Die $V_{\max}$ -Werte verhielten sich nicht wie 1:2:3:4:5 (Tab. 2, Spalte 5). Die K_M -Werte waren nicht identisch (Abb. 6).
 - b) Aus den beiden v-Werten bei der Proteinkonzentration c_5 wurde aus dem Lineweaver-Burk-Diagramm der K_M -Wert bestimmt. Für alle anderen Proteinkonzentrationen wurde nur der v-Wert bei [PMS] = 10^{-3} mol/l eingetragen. Aus diesem v und dem ermittelten K_M -Wert wurde für jede Proteinkonzentration das $V_{\max}$ entnommen. Auch diese $V_{\max}$ -Werte

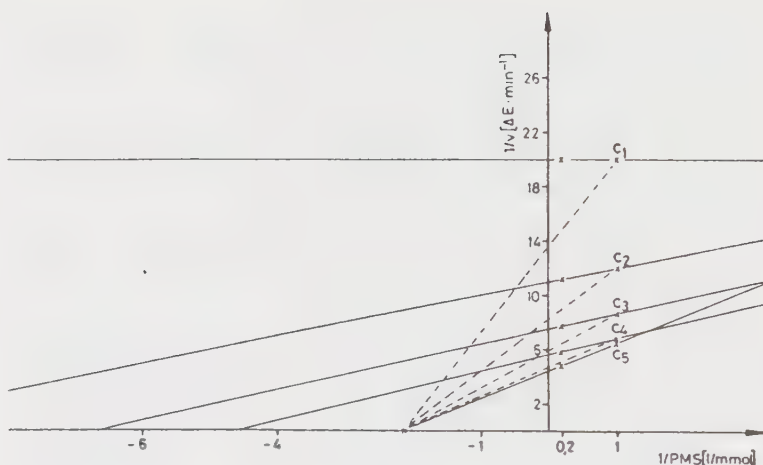


Abbildung 6 und Tabelle 2:

Bestimmung von Maximalgeschwindigkeiten mit EA I = PMS

Die Reaktionsgeschwindigkeiten v wurden für steigende Proteinkonzentrationen bei zwei PMS-Konzentrationen gemessen (Spalte 2 - 4). Durch graphische Extrapolation (Lineweaver-Burk-Diagramm) (Abb. 6), wurden die $V_{\max}$ -Werte bestimmt (Spalte 5 u.6).

Gerade	Proteinkonzentration (mg/ml)	$v(\Delta E/\text{min})$		$V_{\max}^*$	$V_{\max}^{**}$
		$[\text{PMS}] = 1\text{mmol/l}$	$[\text{PMS}] = 5\text{mmol/l}$	$(\Delta E/\text{min})$	$(\Delta E/\text{min})$
c_1	0,058	0,050	0,050	0,050	0,074
c_2	0,116	0,083	0,089	0,091	0,122
c_3	0,174	0,116	0,130	0,154	0,172
c_4	0,232	0,147	0,172	0,179	0,218
c_5	0,290	0,156	0,208	0,227	0,227

* $V_{\max}$ aus beiden PMS-Konzentrationen bestimmt

** $V_{\max}$ aus K_M und $[\text{PMS}] = 1\text{mmol/l}$ bestimmt

verhielten sich nicht wie 1:2:3:4:5 (Tab. 2, Spalte 6; Abb.6).

Aus allen aufgeführten Daten ist ersichtlich, daß die mit PMS erhältlichen Meßergebnisse für einen Routinetest nicht verwertbar sind.

Als Alternative zum PMS wurde Meldolablauf (7-Dimethylamino-1,2-benzophenoxazin) als primärer Elektronenakzeptor getestet.

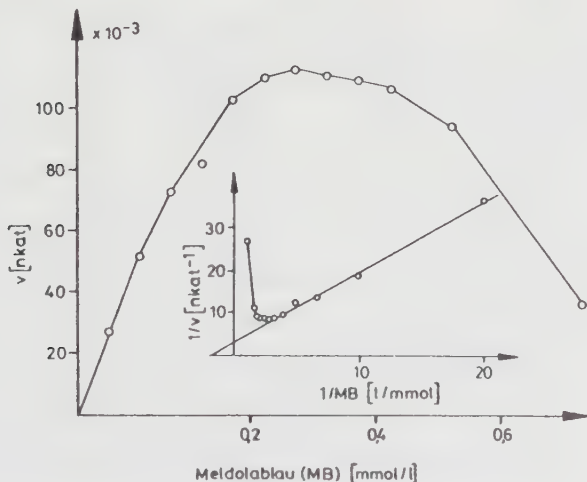


Abbildung 7: Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit der Acyl-CoA-Dehydrogenasereaktion von der Meldolablaufkonzentration. INT, $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$; 4:o-CoA, 10^{-4} mol/l ; BICIN-KOH, (pH 8,0), $0,2 \text{ mol/l}$; Triton X-100, 0,15 %; Temperatur 30°C .

Kinetische Messungen mit Meldolablauf (MB) zeigten, daß eine Hemmung oberhalb der Konzentration von $0,3 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$ auftritt (Abb. 7). Diese Konzentration ist niedriger als die Sättigungskonzentration, so daß die Maximalgeschwindigkeit $V_{\text{max(MB)}}$ experimentell nicht erreichbar ist. Daß MB trotzdem als EA I verwendet werden kann, zeigen die folgenden Messungen (Abb.8):

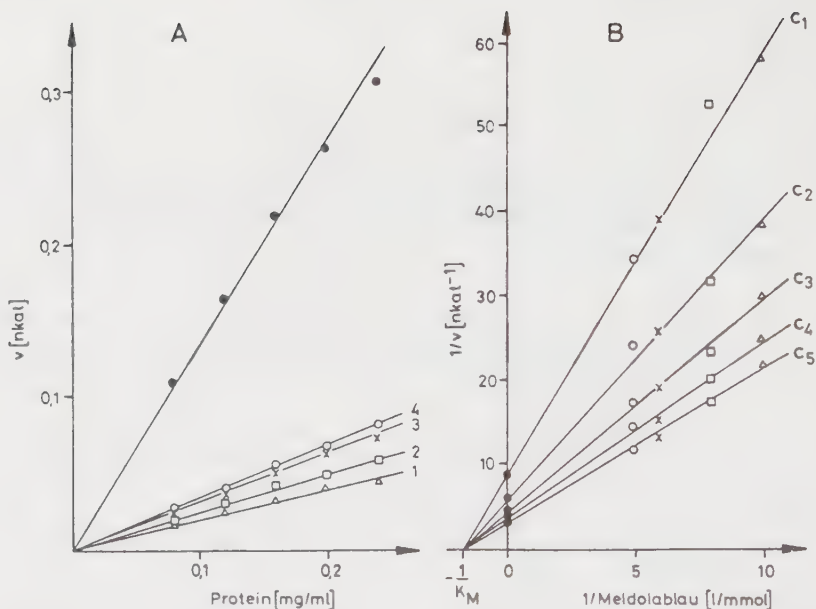


Abbildung 8: Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit der Acyl-CoA-Dehydrogenasereaktion von der Meldolablaukonzentration bei fünf verschiedenen Proteinkonzentrationen c_1 bis c_5 . Proteinkonzentrationen: $c_1 = 0,08 \text{ mg/ml}$; $c_2 = 0,12 \text{ mg/ml}$; $c_3 = 0,16 \text{ mg/ml}$; $c_4 = 0,2 \text{ mg/ml}$; $c_5 = 0,24 \text{ mg/ml}$. Meldolablaukonzentrationen: $\Delta = 0,1 \text{ mol/l}$; $\square = 0,125 \text{ mmol/l}$; $\times = 0,175 \text{ mmol/l}$; $\circ = 0,2 \text{ mmol/l}$; $\bullet = \infty$.

- A Für jede Meldolablaukonzentration erhält man eine lineare Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit von der Proteinmenge (Geraden 1 bis 4).
- B Für jede Proteinkonzentration erhält man im Lineweaver-Burk-Diagramm eine Gerade (c_1 bis c_5). Alle Geraden haben denselben Schnittpunkt mit der Abszisse. Ihre Schnittpunkte mit der Ordinate, die $V_{\max}$ -Werte, geben die Maximalgeschwindigkeiten bei unendlicher Meldolablaukonzentration an.

Die so ermittelten $V_{\max}$ -Werte sind in A gegen die Proteinkonzentration aufgetragen. Es wird eine lineare Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit bei unendlicher Meldolablaukonzentration erhalten.

Es wurden bei vier verschiedenen MB-Konzentrationen Meßreihen durchgeführt, in denen die Anfangsgeschwindigkeit v in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration bestimmt wurde. Die vier Geraden 1 - 4 sind in Abb. 8 A dargestellt. Trägt man dieselben Meßwerte in Abhängigkeit von der MB-Konzentration in einem Lineweaver-Burk-Diagramm auf, so ergibt sich für jede Enzymkonzentration eine Gerade (c_1 bis c_5 , Abb. 8 B). Man erhält aus jeder Geraden das zugehörige $V_{\max}$ und für alle Geraden denselben K_M -Wert ($5,56 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$).

Die extrapolierten $V_{\max}$ -Werte sind in der Abb. 8 A als v -Werte bei unendlicher MB-Konzentration in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration eingetragen. Es ist damit gezeigt, daß der Umsatz von MB der Michaelis-Menten-Kinetik genügt. Auch wenn MB nicht in Sättigungskonzentrationen eingesetzt wird, ergibt sich eine lineare Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit von der Enzymkonzentration (Abb. 8A). Der K_M -Wert ist unabhängig von der Enzymkonzentration (Abb. 8 B), sodaß sich $V_{\max}$ aus dem K_M -Wert und nur einem v -Wert extrapolieren läßt. Diese Extrapolation kann graphisch nach Lineweaver-Burk durchgeführt werden oder rechnerisch durch Multiplikation des Meßwertes mit dem Faktor 6,56. Dieser Faktor errechnet sich aus der Michaelis-Menten-Gleichung wie folgt:

$$V_{\max(\text{MB})} = \frac{v \cdot (K_{M(\text{MB})} + [\text{MB}])}{[\text{MB}]} \quad K_{M(\text{MB})} = 5,56 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$$

(vgl. Abb. 8 A)

$$[\text{MB}] = 1 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$$

$$V_{\max(\text{MB})} = \frac{v \cdot 6,56 \times 10^{-4} \text{ mol/l}}{1 \times 10^{-4} \text{ mol/l}} = 6,56 \cdot v$$

$$\underline{F = 6,56}$$

3.1.2. Wahl des sekundären Elektronenakzeptors EA II

Für 2,6-Dichlorphenolindophenol (DCI) wurde bei Konzentrationen über $5 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ eine Hemmung beobachtet, die unabhängig vom verwendeten EA I ist (Abb. 9). DCI kann also nicht im Über-

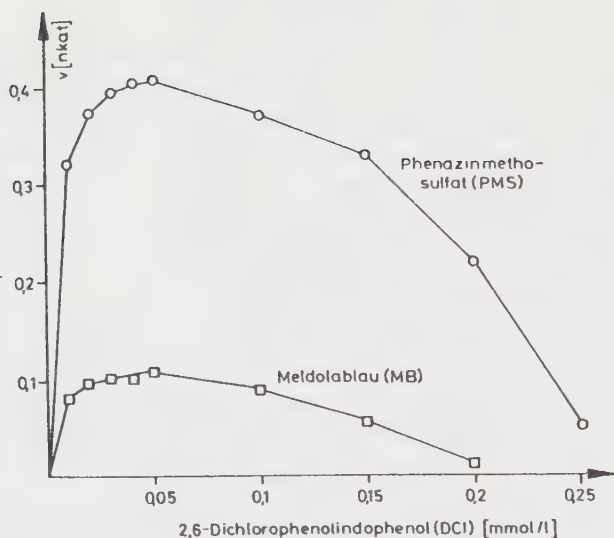


Abbildung 9: Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit der Acyl-CoA-Dehydrogenasereaktion von der Konzentration des 2,6-Dichlorphenolindophenols (DCI). Als primäre Elektronenakzeptoren wurden 0,125 mmol/l PMS (○—○) und 0,1 mmol/l MB (□—□) benutzt. 4:O-CoA, 0,1 mmol/l; Phosphatpuffer (pH 6,8), 0,2 mol/l; Temperatur 30°C.

schuß angeboten werden und ist daher als terminaler Akzeptor ungeeignet. Statt dessen wurde das Tetrazoliumsals Jodnitrotetrazoliumchlorid (INT) verwendet, dessen Formazan in Gegenwart von Triton X-100 in Lösung gehalten werden konnte. So gelang die Messung der Formazanbildung kontinuierlich bei 492 nm ($\epsilon = 1,94 \times 10^4 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Kinetische Messungen mit INT ergaben, daß die v -Werte der Michaelis-Menten-Beziehung folgen. (Abb. 10).

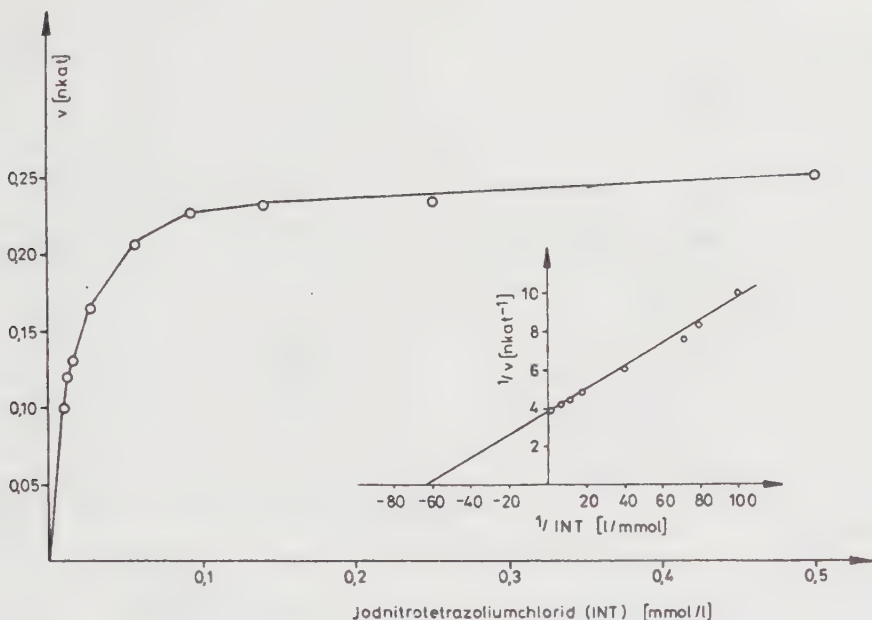


Abbildung 10: Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit der Acyl-CoA-Dehydrogenasereaktion von der Konzentration des Jodnitrotetrazoliumchlorids (INT). MB, 0,1 mmol/l; 4:O-CoA, 0,1 mmol/l; BICIN-KOH, (pH 8,0), 0,2 mol/l; Triton X-100, 0,15 %; Temperatur, 30°C.

3.1.3 Testsystem für Acyl-CoA-Dehydrogenasen

Auf Grund der Ergebnisse dieser Untersuchungen wurde ein Testsystem mit MB als EA I und INT als EA II zusammengestellt. Zur Optimierung wurden verschiedene Parameter untersucht: Temperaturabhängigkeit (Abb. 11), pH-Abhängigkeit (Abb. 12), Detergentienwirkung (Abb. 13), Wahl des Puffersystems (Abb. 14) und die Abhängigkeit von zweiwertigen Ionen. Ein Einfluß solcher Ionen wurde von Ward und Fairbairn beschrieben (85), konnte

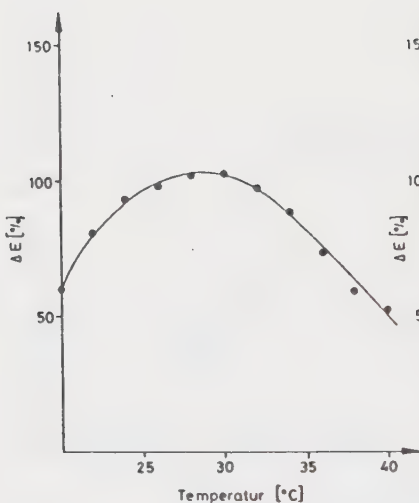


Abbildung 11

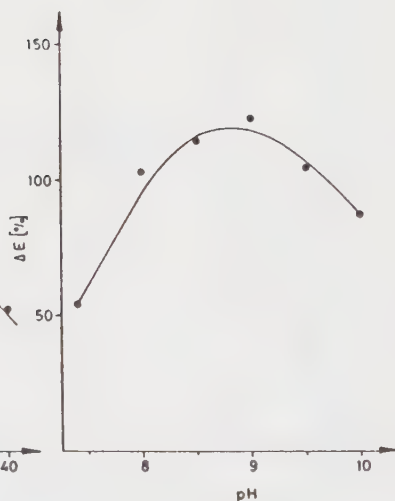


Abbildung 12

Abbildung 11: Abhängigkeit des Acyl-CoA-Dehydrogenasetests von der Temperatur. Der Meßwert bei 30°C (entsprechend der gewählten Temperatur im modifizierten Test, Tab. 2) wurde gleich 100 % gesetzt. MB, 1,0 mmol/l; INT, 0,25 mmol/l; 10:O-CoA, 0,1 mmol/l; Phosphatpuffer (pH 8,0), 50 mmol/l; Triton X-100, 0,15 %.

Abbildung 12: Abhängigkeit des Acyl-CoA-Dehydrogenasetests vom pH-Wert. Der Meßwert bei pH 8,0 (entsprechend dem gewählten pH-Wert im modifizierten Test, Tab. 2), wurde gleich 100 % gesetzt. MB, 1,0 mmol/l; INT, 0,25 mmol/l; 10:O-CoA, 0,1 mmol/l; Phosphatpuffer, 50 mmol/l; Triton X-100, 0,15 %; Temperatur 30°C.

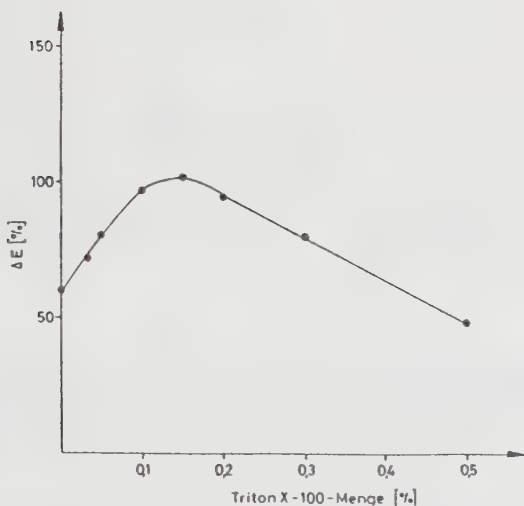


Abbildung 13

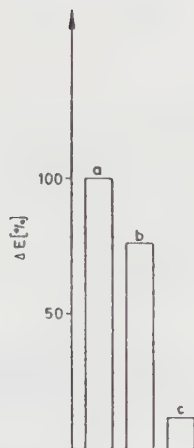


Abbildung 14

Abbildung 13: Abhängigkeit des Acyl-CoA-Dehydrogenasetests von der Detergenmenge. Der Meßwert bei 0,15 % (entsprechend der gewählten Menge im modifizierten Test, Tab. 2) wurde gleich 100 % gesetzt. MB, 1,0 mmol/l; INT, 0,25 mmol/l; 10:O-CoA, 0,1 mmol/l; Phosphatpuffer (pH 9,0), 50 mmol/l; Temperatur, 30°C.

Abbildung 14: Acyl-CoA-Dehydrogenasereaktion in verschiedenen Puffern. a = BICIN-KOH (pH 8,0), 0,2 mmol/l; b = $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 8,0), 0,2 mmol/l; c = Tris-HCl (pH 8,0), 0,2 mmol/l. Alle anderen Bedingungen wurden gewählt wie in Tab. 2 angegeben.

aber mit Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} und Ca^{2+} unter den gewählten Bedingungen nicht gefunden werden.

Bedingt durch die sehr große Zahl der Möglichkeiten zur Optimierung des Testsystems konnten nicht alle Parametervariationen ausgetestet werden. Aus der Fülle der Meßreihen unter verschiedenen Bedingungen wurden bestimmte Parameter als günstig ausgewählt, die zur Erstellung des in Tabelle 2 aufgeführten Testsystems führten.

Tabelle 2: Modifizierter Enzymtest zur Bestimmung von Acyl-CoA-Dehydrogenaseaktivitäten. Es wird die Absorptionsänderung bei 492 nm registriert. Die Meßtemperatur beträgt 30°C.

Substanz	Konzentration der verwendeten eingesetzte Konzentration		
	Lösung (mol/l)	Menge (µl)	im Test(mol/l)
BICIN-KOH pH = 8,0	0,2	690 - 890	ca 0,2
Triton X-100 (dem Puffer zugesetzt)	0,15 %	-	ca 0,15 %
MB	2×10^{-3}	50	$1,0 \times 10^{-4}$
INT	5×10^{-3}	50	$2,5 \times 10^{-4}$
Acyl-CoA	1×10^{-2}	10	$1,0 \times 10^{-4}$
Enzymlösung		≤ 200	

Eine mit diesem Test erstellte Michaelis-Menten Kinetik für Butyryl-CoA im Rohextrakt aus Acetontrockenpulver von Rinderlebermitochondrien ist in Abbildung 15 dargestellt. Abbildung 16 zeigt die lineare Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Proteinmenge bei Verwendung der drei Substrate 4:O-CoA, 8:O-CoA und 16:O-CoA.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde neben 4:O-CoA als mittelkettiges Substrat 10:O-CoA und nicht 8:O-CoA gewählt, da

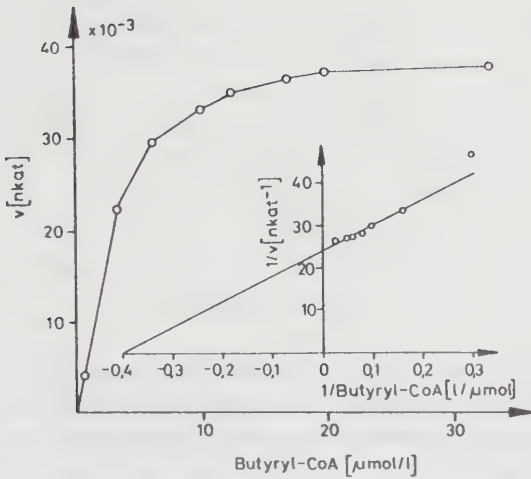


Abbildung 15: Bestimmung von Acyl-CoA-Dehydrogenaseaktivitäten mit dem modifizierten Enzymtest. Michaelis-Menten-Diagramm für Butyryl-CoA. MB, 0,1 mmol/l; INT, 0,25 mmol/l; 4:0-CoA, 0,1 mmol/l; BICIN-KOH (pH 8,0), 0,2mol/l; Triton X-100, 0,15 %; Temperatur, 30°C.

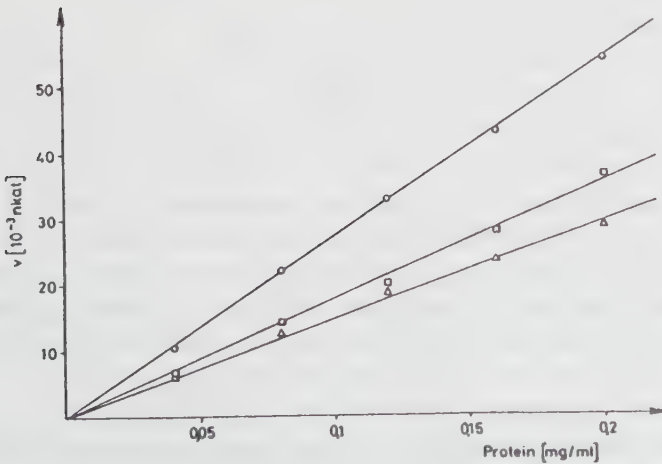


Abbildung 16

Abbildung 16: Bestimmung von Acyl-CoA-Dehydrogenaseaktivitäten mit dem modifizierten Enzymtest. Lineare Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit von der Proteinkonzentration für drei Acyl-CoA-Ester: (○—○) 4:0-CoA; (□—□) 8:0-CoA; (△—△) 16:0-CoA. Die Testbedingungen sind in Tabelle 2 angegeben.

es dieselbe Kettenlänge hat wie 4c-10:1-CoA. Messungen mit 16:0-CoA wurden nicht routinemäßig durchgeführt.

Der Enzymtest ist unabhängig von ETF. Das wurde durch Messungen mit länger gelagerten Rohextrakten, in denen das empfindliche ETF vermutlich zerstört war, wahrscheinlich gemacht: Ohne den primären Elektronenakzeptor Meldolablauf war keine Acyl-CoA-Dehydrogenaseaktivität nachweisbar, bei Zusatz von MB konnte Aktivität gemessen werden. Den endgültigen Beweis lieferten Aktivitätsmessungen mit gereinigten Enzymfraktionen. Auch hier war das Testsystem voll funktionsfähig.

Die Bestimmungen von Substratspezifitäten der verschiedenen Acyl-CoA-Dehydrogenasen zeigten, daß die K_M -Werte in einem Bereich von zwei Zehnerpotenzen variieren: Für 10:0-CoA ergibt sich mit der Acyl-CoA-Dehydrogenase der geringsten Affinität ein K_M -Wert von ca. 10^{-4} mol/l, für 4:0-CoA ein K_M von ca. 10^{-5} mol/l. Mit anderen Substraten werden K_M -Werte um 10^{-6} mol/l gemessen (Kap. 3.5.1. S. 92). Um im photometrischen Test annähernd Substratsättigung vorzugeben, hätten Substratkonzentration entsprechend mindestens $10 \times K_M$, also mindestens 10^{-3} mol 10:0-CoA/l und 10^{-4} mol 4:0-CoA/l eingesetzt werden müssen. Aus Gründen der Wirtschaftlichkeit wurden für die Routinemessungen immer 10^{-4} mol Substrat/l (0,1 μ mol/Testansatz) zugesetzt, so daß Substratsättigung nur für 4:0-CoA vorlag. Für 10:0-CoA entsprach die eingesetzte Menge ungefähr dem K_M -Wert.

Zur Umrechnung von v-Werten auf $V_{\max}$ -Wert wurden in die Michaelis-Menten-Gleichung v und $V_{\max}$ in % eingesetzt:

$$\frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]} = v(\%)$$

Mit $V_{\max} = 100 \%$ ergibt sich, wieviel % der Maximalgeschwindigkeit bei einer bestimmten Substratkonzentration $[S]$ der gemessene v -Wert entspricht. Durch Verhältnisrechnung kann man aus der errechneten Prozentzahl den Absolutwert für $V_{\max}$ ermitteln. Für $[10:0\text{-CoA}] = 10^{-4} \text{ mol/l}$ beträgt $v = 43,5 \%$ und $V_{\max} = 2,3 v$.

Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurde aus der Anfangsgeschwindigkeit das ΔE pro 6 min bestimmt. Unter Berücksichtigung der notwendigen Extrapolationen wurde die Enzymaktivität bezogen auf die Proteinmenge (kat/kg) oder auf die Volumeneinheit (kat/l) wie folgt berechnet:

$$\frac{E}{\epsilon \cdot d} = c$$

$$\frac{\Delta E}{\epsilon \cdot d} \cdot \frac{1}{t} = \Delta c \cdot \frac{1}{t} = \frac{\Delta \text{mol}}{\text{Vol} \cdot t}$$

$$\frac{\Delta E}{\epsilon \cdot d} \cdot \frac{\text{Vol}}{t} = \frac{\Delta \text{mol}}{t} \hat{=} \text{Enzymaktivität}$$

$t = 360 \text{ s}$; $\epsilon = 19.400 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; $d = 1 \text{ cm}$; $\text{Vol} \hat{=} 1$; Enzymaktivität $\hat{=} \text{Katal} = \text{mol/s}$; $\text{Vol}/\epsilon \cdot d \cdot t = 0,1432 \times 10^{-6} \text{ mol/s}$

Daraus folgt:

Durch Multiplikation von ΔE mit $0,1432 \times 10^{-6} \text{ mol/s}$ erhält man die Enzymaktivität in Katal. Durch Extrapolation auf $V_{\max}^{(\text{MB})}$ (Faktor = 6,56, vgl. S. 39), folgt: $\text{kat}_{4:0} \hat{=} 0,94 \times 10^{-6} \Delta E$. Für $10:0\text{-CoA}$ ist zudem die Extrapolation auf die Substratsättigung notwendig (Faktor 2,3, s.o.): $\text{kat}_{10:0} \hat{=} 2,16 \cdot 10^{-6} \Delta E$.

Die spezifische Aktivität erhält man durch Division durch die eingesetzte Proteinmenge (in kg). Die Volumenaktivität erhält man durch Division durch das eingesetzte Probenvolumen (in l).

3.2. Analytische Differenzierung der Acyl-CoA-Dehydrogenasen

Zur analytischen Unterscheidung verschiedener Acyl-CoA-Dehydrogenasen, die das gleiche Substrat umsetzen, wurde die elektrophoretische Auftrennung der nativen Proteine im Polyacrylamidgel ausprobiert. Durch histochemische Färbemethoden sollte versucht werden, die Acyl-CoA-Dehydrogenasen im Gel zu lokalisieren und zu differenzieren.

Das meist verwendete Elektrophoresesystem ist das System nach Davis (= Maurer 1) (62, 63). Es arbeitet bei alkalischem pH-Wert (Elektrodenpuffer pH 8,4; Trenngelpuffer pH 8,9), der generell für eine Proteinauftrennung gut geeignet ist. Solche

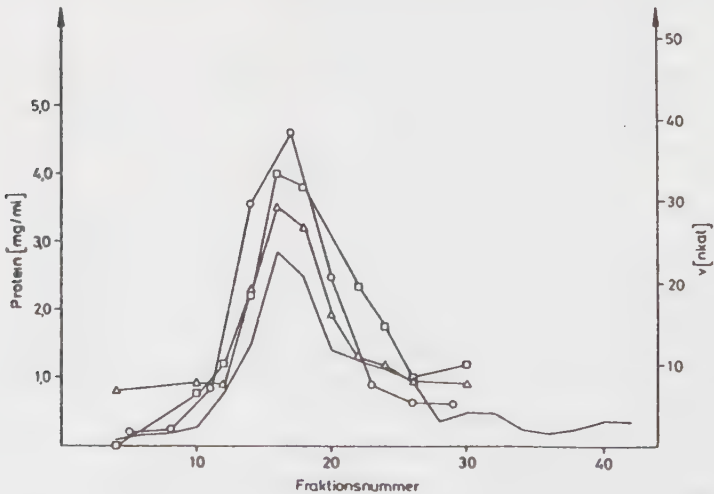


Abbildung 17: Präparative Elektrophorese nach Davis (62) (Kap. 2.2.3.1., S. 14) im Saccharose-Dichtegradienten. Es wurde eine durch Ammoniumsulfatfällung (0 - 45 % Sättigung mit festem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) erhaltene Acyl-CoA-Dehydrogenasefraktion getrennt. Dehydrogenaseaktivität wurde mit 4:O-CoA (○—○), 8:O-CoA (□—□) und 16:O-CoA (△—△) bestimmt.

Gele zeigen mit Rohextrakt aus Acetontrockenpulver von Rinderlebermitochondrien gut getrennte Proteinbanden, die Anfärbung der Acyl-CoA-Dehydrogenasen gelang jedoch nicht. Es konnte gezeigt werden, daß der alkalische pH-Wert im Gel die Anfärbung verhindert, obwohl die Enzymaktivität noch vorhanden ist: Im selben Puffersystem nach Davis wurde eine trägerfreie präparative Elektrophorese im Saccharosegradienten durchgeführt. Im Eluat wurden 50 - 60 % der Enzymaktivitäten zurückgewonnen. Die Auftrennung der Acyl-CoA-Dehydrogenasen wurde jedoch in diesem System nicht erreicht (Abb. 17).

Vier weitere Elektrophoresesysteme wurden auf ihre Eignung überprüft: das System nach Hedrick und Smith (86), das System nach Williams und Reisfeld (64), ein kontinuierliches System (87) und ein System für saure Proteine, in dem die elektrophoretische Wanderung zur Kathode erfolgt (88). Hier sei nur das beschrieben, mit dem die Färbung gelang: das diskontinuierliche Elektrophoresesystem von Williams und Reisfeld, das vom Maurer (63) als System M 6 aufgeführt wird. Es arbeitet im neutralen pH-Bereich (Elektrodenpuffer pH 7,0; Trenngelpuffer pH 7,5). Die Proteinauftrennung ist im Vergleich mit dem oben beschriebenen System (Maurer 1) generell schlechter. Mit diesem Verfahren ließen sich jedoch die verschiedenen Acyl-CoA-Dehydrogenaseaktivitäten voneinander trennen und im Polyacrylamidgel anfärben.

Die Färbelösung enthielt Substrat, Meldolablauf, Jodnitrotetrazoliumchlorid und Triton X-100 in BICIN-Puffer. Die Oxidation des Substrats wurde so mit der Reduktion des Tetrazoliumsalses gekoppelt. Die Acyl-CoA-Dehydrogenasen wurden durch die roten Formazanbanden lokalisiert. Das Detergens erleichterte die Diffusion des Substrats in das Gel und beschleunigte dadurch die Färbung, ohne die Bandenschärfe zu beeinträchtigen.

Zur Anfärbung wurden zwei Substrate verwendet, 4:0-CoA und 10:0-CoA. Nach Auftrennung eines Rohextraktes wurden durch Färbung mit dem Substrat 10:0-CoA zwei deutlich getrennte schmale Ban-

den erhalten (Abb. 18 B). Es existieren also zwei verschiedene Acyl-CoA-Dehydrogenasen, die Fettsäuren der Kettenlänge C_{10} umsetzen. Bei Färbung mit dem Substrat 4:O-CoA entstand eine breite Bande (Abb. 18 A). Der obere Teil dieser Bande hatte denselben R_F -Wert wie die obere Bande im 10:O-gefärbten Gel.

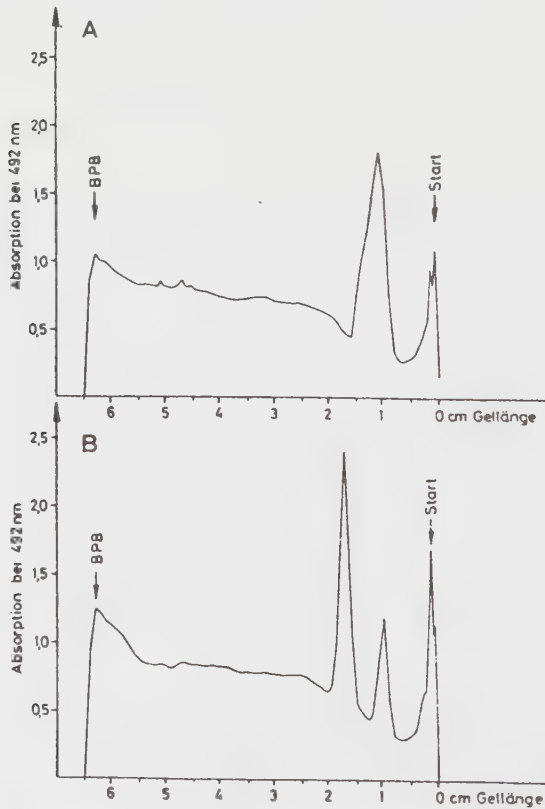


Abbildung 18: Spezifische Anfärbung von Acyl-CoA-Dehydrogenasen im analytischen Polyacrylamidgelsystem nach Williams und Reisfeld (64) (Kap. 2.2.3.2., S.15). Enzymfraktion: Rohextrakt. Zur spezifischen Anfärbung benutzte Substrate: A, 4:O-CoA; B, 10:O-CoA. BPB = Bromphenolblau.

Unter der breiten Bande konnten zwei dicht beieinanderliegende Acyl-CoA-Dehydrogenasen vermutet werden, die beide das Substrat 4:O-CoA umsetzen und deren obere außerdem auch 10:O-CoA akzeptiert.

Auch dieses Elektrophorese-System wurde durch ein präparatives Verfahren überprüft. Hier wurde Polyacrylamid als Träger verwendet. Im Elutionsprofil ließen sich die im analytischen Gel erhaltenen Befunde bestätigen: Mit 10:O-CoA wurden zwei Aktivitätsgipfel gemessen, mit 4:O-CoA ein breiter Gipfel (Abb.19)

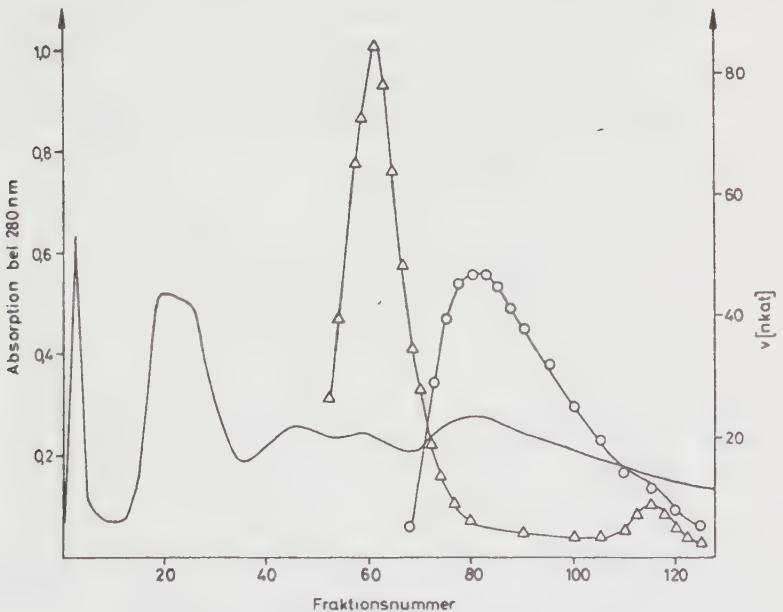


Abbildung 19: Präparative Elektrophorese nach Williams und Reisfeld (63,64). Enzymfraktion: Acyl-CoA-Dehydrogenasefraktion nach DEAE-Cellulose-Desorption (0,04-0,15 mol NaCl/l) und Ammoniumsulfatfällung (40 - 70 % Sättigung mit festem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) Dehydrogenaseaktivität wurde mit 4:O-CoA (○—○) und mit 10:O-CoA (Δ—Δ) bestimmt.

An angereinigten Fraktionen ließ sich später zeigen, daß die breite Aktivitätsbande, die mit 4:O-CoA erhalten wird, tatsächlich von zwei unterschiedlichen, dicht übereinanderliegenden Acyl-CoA-Dehydrogenasen hervorgerufen wird. Die untere setzt nur 4:O-CoA um, nicht aber 10:O-CoA. Die obere reagiert mit beiden Substraten (vgl. Abb. 29, S. 77).

Die Spezifitäten der drei Acyl-CoA-Dehydrogenasen gegenüber 4:O-CoA und 10:O-CoA entsprechen also den in der Schweineleber beschriebenen (Abb. 20): Färbung nur mit 4:O-CoA: short chain acyl-CoA dehydrogenase; mit 4:O-CoA und 10:O-CoA: long chain acyl-CoA dehydrogenase. Da diese Namen durch ihre Übersetzung ins Deutsche sehr umständlich sind (kurzkettige Fettsäure-CoA-Ester umsetzende Acyl-CoA-Dehydrogenase usw.; vgl. S. III) werden im Folgenden statt dessen die Bezeichnungen DH I, DH II, DH III verwendet.

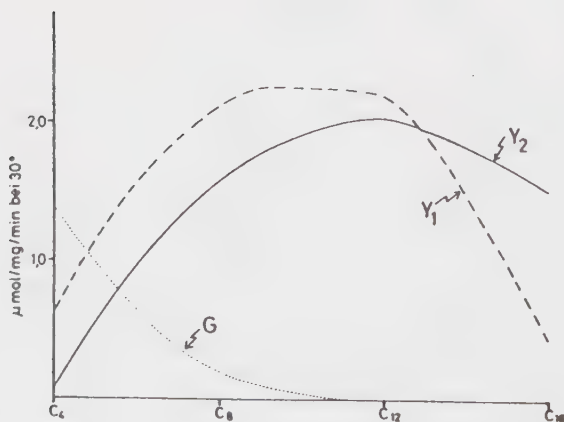


Abbildung 20: Spezifität der Acyl-CoA-Dehydrogenasen der Schweineleber für Substrate verschiedener Kettenlängen. Entnommen aus: F.L. Crane, J.G. Hauge und H. Beinert, Biochem.Biophys.Acta 17,1955, S. 293.

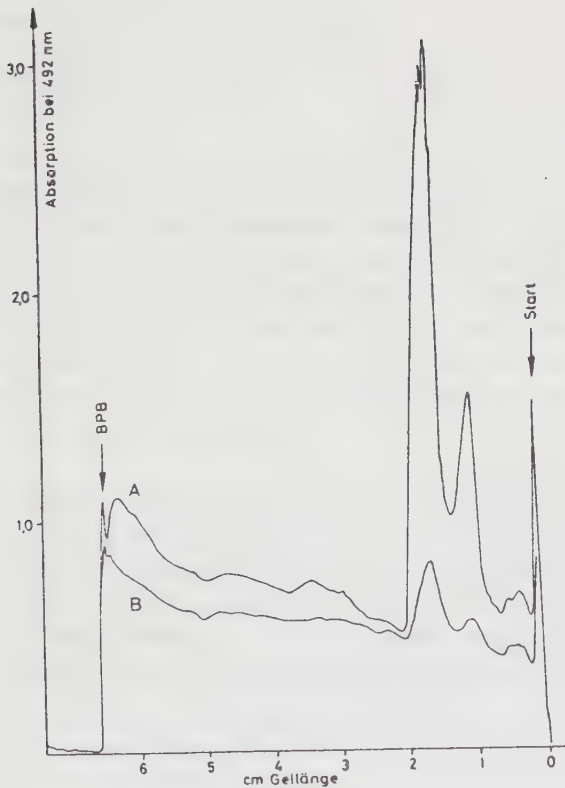


Abbildung 21: Spezifische Anfärbung von Acyl-CoA-Dehydrogenasen im analytischen Polyacrylamidsystem nach Williams und Reisfeld (63,64). Empfindlichkeit der Anfärbung mit verschiedene Substraten, die von denselben Enzymen umgesetzt werden. Enzymfraktion: Rohextrakt. Zur spezifischen Anfärbung wurde 10:0-CoA (Kurve A) und 16:0-CoA (Kurve B) verwendet. BFB = Bromphenolblau.

Durch die Differenzierungsmöglichkeit im analytischen Gel konnte demonstriert werden, daß mit dem in der Literatur zusätzlich verwendeten Substrat 16:0-CoA dieselben Banden angefärbt werden, wie mit 10:0-CoA (obere und untere Formazanbande entsprechend DH II und DH III), nur läuft die Formazanbildung wesentlich langsamer (Abb. 21).

Außerdem wurde gefunden, daß die Acyl-CoA-Dehydrogenase, die die Ausbildung der oberen Formazanbande bewirkt (DH II), auch das ungesättigte Substrat 4c-10:1-CoA oxidiert. Dieses Substrat wird von der DH I absolut nicht und von der DH III nur in so geringem Maße umgesetzt, daß nur die DH II durch dieses Substrat im Gel lokalisierbar ist. 4c-10:1-CoA ist also für die Anfärbung im Polyacrylamidgel ein spezifisches Substrat für die DH II.

Auch im photometrischen Test ist die Reaktion der DH III mit 4c-10:1-CoA so gering, daß mit diesem Substrat die Messung der Aktivität der DH II selektiv in Gegenwart der anderen Acyl-CoA-Dehydrogenasen möglich ist (vgl. S. 108). 4c-10:1-CoA wurde daher während der Kontrolle der Enzymreinigung zur Überprüfung der Anreicherung und Abtrennung der DH II eingesetzt.

3.3. Enzymreinigung

3.3.1. Darstellung von Ausgangsmaterial

Aus der Rinderleber wurden Mitochondrien durch differenzielle Zentrifugation isoliert (68). Daraus wurde ein Acetontrockenpulver hergestellt (69), das bei -18°C ohne Verlust an Acyl-CoA-Dehydrogenaseaktivität mindestens ein Jahr lagerfähig ist. Durch Pufferextraktion dieses Acetontrockenpulvers wurden die β -Oxidationsenzyme gelöst. Nach Zentrifugieren bei 100.000xg waren sie im Überstand enthalten.

3.3.2. Bestimmung von Acyl-CoA-Dehydrogenaseaktivitäten in frischer Rinderleber

Ein exakter Vergleich der Acyl-CoA-Dehydrogenaseaktivitäten in ganzer Leber, in Mitochondrien und in Trockenpulverextrakten war schwierig durchzuführen, da die Enzyme zur Messung in Lösung gebracht werden mußten.

Verschiedene Methoden wurden miteinander verglichen: Aufbrechen der Organellen durch Frieren-Tauen, durch osmotischen Schock und durch Behandlung mit Triton X-100 (70). Durch die Extrapolation der Meßwerte auf die großen Volumina der Aufarbeitung waren die Meßergebnisse mit einem relativ großen Fehler behaftet.

Acyl-CoA-Dehydrogenaseaktivitäten wurden an zwei Stationen der Aufarbeitung bestimmt: zu Beginn nach Abtrennung von schlecht zerkleinertem Gewebe, ganz gebliebenen Zellen und Zellkernen im 800xg-Überstand und vor der Acetonfällung in den gereinigten Mitochondrien, dem 8000xg-Sediment (Tab. 3).

Nach Frieren-Tauen und nach Triton-X-100-Behandlung erfolgte eine Zentrifugation zur Abtrennung aller Partikel. Der osmotische Schock wurde in der Meßküvette durchgeführt und daher

Tabelle 3: Vergleich der Acyl-CoA-Dehydrogenaseaktivitäten in frischer Leber. Verschiedene Aufschlußmethoden wurden angewandt. In der letzten Zeile sind die entsprechenden Werte für Trockenpulverextrakt angegeben.

Fraktion	g Protein pro kg Leber	mit 4:0-CoA		mit 4c-10:1-CoA		mit 10:0-CoA	
		bestimmte Aktivität	nkcat/mg Protein	bestimmte Aktivität	nkcat/kg Leber	bestimmte Aktivität	nkcat/mg Protein
800 x g ũ Frieren- Tauen	84,3	0,208		0,110	9 230	0,802	67 500
800 x g ũ osmotischer Schock	202,0	0,078		0,023	5 510	0,278	56 300
800 x g ũ Triton- Extraktion	126,5	0,158		0,079	8 460	0,546	69 100
8000 x g S Frieren- Tauen	14,7	0,895		0,187	2 750	1,27	18 670
8000 x g S osmotischer Schock	51,8	0,26		0,044	2 280	0,648	33 630
8000 x g S Triton- Extraktion	20,6	1,0		0,238	4 920	1,825	41 000
Robextrakt aus Aceton- trocken- pulver	3,0	3,55		0,445	1 335	4,45	13 350

waren Partikel während der Messungen zugegen. Daraus erklären sich die hohen Proteinwerte und die niedrigen spezifischen Aktivitäten nach osmotischem Schock (Tab. 3, 2. und 5. Reihe). Hier sind auch die Gesamtaktivitäten schlechter, es wurden die wenigsten Organellen aufgeschlossen.

Frieren-Tauen war im 800xg-Überstand gleich effektiv wie Triton X-100-Behandlung (Tab. 3, 1. und 3. Reihe). Im 8000xg-Sediment betrug nach Frieren-Tauen die Gesamtaktivität nur ca 60 % derjenigen nach Triton X-100-Behandlung (Tab. 3, 4. und 6. Reihe). Während der Aufarbeitung vom 800xg-Überstand zum 8000xg-Sediment blieb die DH I-Aktivität annähernd konstant, die DH II-Aktivität und die DH III-Aktivität sanken auf je zwei Drittel. Davon wurden nach Trockenpulverextraktion im Rohextrakt 27 bis 52 % wiedergefunden.

3.3.3. Stabilität der Acyl-CoA-Dehydrogenasen im Rohextrakt

Für die Enzymreinigung wurde Tris-HCl-Puffer (0,05 mol/l, pH 7,5) zur Extraktion des Acetontrockenpulvers gewählt. Der Einfluß verschiedener Zusätze auf die Stabilität der Acyl-CoA-Dehydrogenasen in solchen Extrakten wurde überprüft (Abb. 22). Art und Konzentration dieser Zusätze sind im Begleittext der Abbildung angegeben.

DTE ist im Rohextrakt ohne Einfluß. Glycerin, FAD und EDTA zeigen einzeln und verstärkt in Kombination eine Schutzwirkung. Der Zusatz von 10^{-5} mol FAD/l und 5×10^{-4} mol EDTA/l bewirkt bei 4°C einen Aktivitätsverlust von nur 10 % innerhalb von acht Tagen. Glycerin verstärkt diesen Effekt nicht weiter.

Zur Darstellung der Rohextrakte wurde daher mit 0,05 mol Tris-HCl/l pH 7,5 + 10^{-5} mol FAD/l und 5×10^{-4} mol EDTA/l extrahiert.

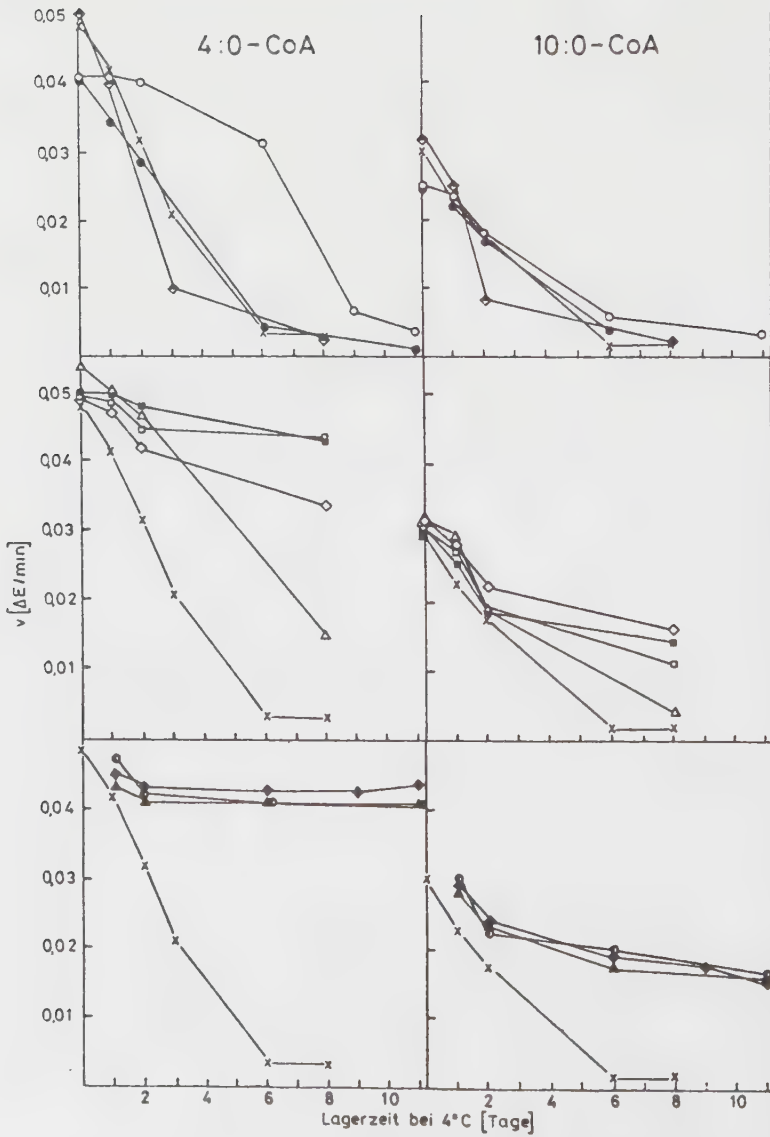


Abbildung 22

Abbildung 22: Haltbarkeit von Rohextrakten mit verschiedenen Zusätzen. Der Rohextrakt wurde im Kühlraum aufbewahrt ($+4^{\circ}\text{C}$).

Linke Spalte: Acyl-CoA-Dehydrogenaseaktivitäten, mit 4:0-CoA bestimmt; rechte Spalte: mit 10:0-CoA bestimmte Aktivitäten.

Folgende Zusätze wurden benutzt:

obere Reihe: 10^{-3} mol DTE/l (o—o); 10^{-4} mol DTE/l (●—●); 40 g BSA/l (◆—◆).

mittlere Reihe: 10^{-3} mol EDTA/l (□—□); 10^{-4} mol EDTA/l (■—■); 10^{-5} mol FAD/l (△—△); 10 % Glycerin (◇—◇).

untere Reihe: 10^{-5} mol FAD/l + 5×10^{-4} mol EDTA/l (▲—▲); 10^{-5} mol FAD/l + 5×10^{-4} mol EDTA/l + 10 % Glycerin (◆—◆); 10^{-5} mol FAD/l + 5×10^{-4} mol EDTA/l + 10 % Glycerin/l + 5×10^{-4} mol DTE/l (⊙—⊙).

Zum Vergleich ist in allen Diagrammen die Aktivität des Rohextraktes ohne Zusätze mit einge-tragen (x—x).

3.3.4. Überprüfung verschiedener Reinigungsverfahren im Rohextrakt

Die Enzymreinigung wurde unter drei Aspekten durchgeführt:

1. Trennung der Acyl-CoA-Dehydrogenasen voneinander
2. Abtrennung der anderen β -Oxidationsenzyme
3. Reinigung der Acyl-CoA-Dehydrogenasen von Fremdproteinen

Die einzelnen in der Literatur beschriebenen Methoden (Tab. 12, S.117) wurden im Rohextrakt auf ihre Verwendbarkeit für die Reinigung der Acyl-CoA-Dehydrogenasen der Rinderleber überprüft. Anschließend wurden die Verfahren miteinander kombiniert, um entsprechend ihrer spezifischen Wirksamkeit optimal eingesetzt werden zu können.

Einige der etwas "altmodischen" Verfahren wurden nicht ausprobiert (Äthanolgefällung, Adsorption an Calciumphosphatgel) oder die Experimente wurden nach ersten Vorversuchen abgebrochen (Hitzegefällung, Säuregefällung, Adsorption an Zinkhydroxidgel, Chromatographie an Hydroxylapatit), da eine Optimierung weniger aussichtsreich schien als bei anderen Methoden. Diese Versuche werden wegen ihrer Unvollständigkeit nicht beschrieben. Als neue Methode wurde die präparative isoelektrische Focussierung getestet.

3.3.4.1. Ammoniumsulfatfällung

Die Bedingungen der Ammoniumsulfatfällung wurden von Beinert übernommen (43). Die Enzymteste wurden mit den dort beschriebenen Substraten durchgeführt. Dieses Verfahren war jedoch für die Rinderleber nicht effektiv, es war weder eine Anreicherung der Dehydrogenasen in bestimmten Fraktionen noch die Auftrennung der einzelnen Dehydrogenasen zu beobachten (Abb. 23).

Abbildung 23: Verteilung der Acyl-CoA-Dehydrogenaseaktivitäten auf die Fraktionen der Ammoniumsulfatfällung. Fraktionierung nach Beinert (43): Rohextrakt (■); 0 - 45 %-Sediment (▤); 45 - 55 %-Sediment (▨); 55 - 65 %-Sediment (▩); 65 - 80 %-Sediment (□). Die Aktivitäten wurden mit 4:O-CoA, 8:O-CoA und 16:O-CoA bestimmt. Es wurde die Enzymaktivität als $\Delta E/min$ eingetragen. Zusätzlich wurden die Rohextraktaktivitäten gleich 100 % gesetzt und die relativen Ausbeuten in den einzelnen Fraktionen in % angegeben.

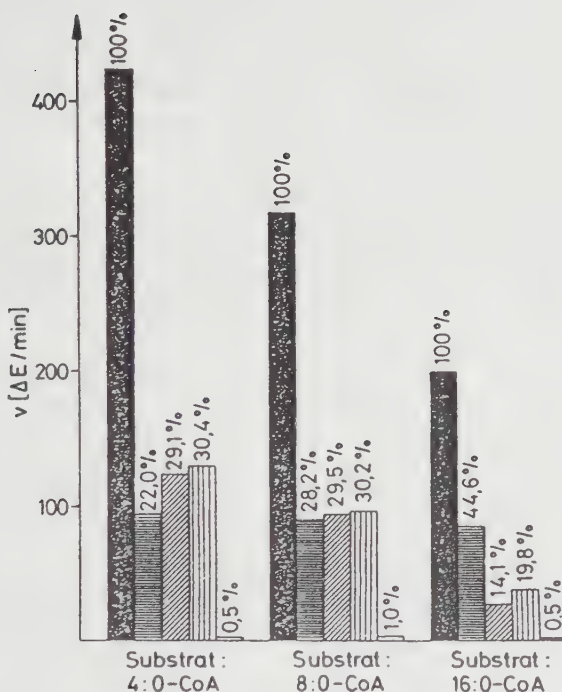


Abbildung 23

Unter schonenderen Bedingungen konnte jedoch eine gute Abtrennung von Fremdproteinen ohne großen Aktivitätsverlust erzielt werden: Die Fällung wurde mit einer Lösung von 3,8 mol $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/\text{l}$ (72) in Trispuffer + FAD + EDTA und zusätzlich DTE durchgeführt. Bei Abtrennung von 50 % Protein wurden 80 % der Enzymaktivitäten erhalten (Tab. 4).

Dieses Verfahren hat aber keine Bedeutung für die Trennung der Acyl-CoA-Dehydrogenasen voneinander.

Tabelle 4: Fällung mit Ammoniumsulfatlösung. Proteinausbeute und Enzymaktivitäten (in % der Aktivität des Rohextraktes) in verschiedenen Fraktionen. Die Daten sind Mittelwerte aus fünf an unterschiedlichen Mengen Acetontrockenpulver durchgeführten Fällungen

Fraktion	Protein [%]	Acyl-CoA-Dehydrogenaseaktivität [%]	
		Substrat = 4:0-CoA	Substrat = 10:0-CoA
Rohextrakt	100	100	100
40%(NH ₄) ₂ SO ₄ - Sediment	42	4 ± 0,4	10 ± 1
70%(NH ₄) ₂ SO ₄ - Sediment	50	80 ± 8	80 ± 8
70%(NH ₄) ₂ SO ₄ - Überstand	8	-	-

3.3.4.2. Adsorption an Alumina C_γ

Rohextrakt wurde nach Green (8) mit Alumina C_γ inkubiert. Dabei binden die Proteine an das Gel. Elution erfolgte mit einer zu 40 % ammoniumsulfatgesättigten Lösung in Puffer (Tris-HCl + FAD + EDTA + DTE). Aus dieser Lösung wurden die Acyl-CoA-Dehydrogenasen durch Erhöhung der Ammoniumsulfatmenge auf 80 % Sättigung ausgefällt.

Es wurde eine effektive Abtrennung von Fremdproteinen erreicht (Tab. 5): Im aufgelösten Sediment waren nur noch 35 % des eingesetzten Proteins enthalten. Die Gesamtaktivität betrug 70 % der Ausgangsaktivität.

Tabelle 5: Proteinausbeute und Enzymaktivitäten in verschiedenen Fraktionen nach Adsorption an Alumina C_Y

Fraktion	Protein %	Acyl-CoA-Dehydrogenaseaktivität					
		Substrat = 4:0-CoA		Substrat = 10:0-CoA			
		nkat/mg	nkat	%	nkat/mg	nkat	%
Rohextrakt	100	1,8	490	100	2,45	650	100
Überstand n. Adsorption	1,8	-	-	-	-	-	-
40%(NH ₄) ₂ SO ₄ - Desorption	49	3,74	485	99	4,3	565	87,0
80%(NH ₄) ₂ SO ₄ - Sediment	35	3,7	344	70	4,9	457	70,3

Man benötigt für dieses Verfahren sehr viel Gel (1 g pro 50 mg Protein). Es ließ sich nicht auf den in Enzympräparationen notwendigen Maßstab übertragen, da hier die Elution nur sehr schlecht gelang.

3.3.4.3. Adsorption an DEAE-Sephadex und an DEAE-Cellulose

Für die Chromatographie an Anionenaustauschern wurde als kationischer Puffer geringer Ionenstärke Tris-HCl (0,05 mol/l) ausgewählt (89). Es wurde die Adsorption an DEAE-Sephadex A-50 und an DEAE-Cellulose DE 52 (Whatman) im Batch-Verfahren untersucht.

Bei pH-Werten von 7,0 , 7,5 und 8,0 wurde die Adsorption ausgetestet und die im Überstand verbliebene Aktivität der Acyl-CoA-Dehydrogenasen bestimmt. Bei pH 7,0 war die Aktivität im Überstand größer als bei pH 7,5 und 8,0. Daher wurde für die Adsorption der pH-Wert von 7,5 ausgewählt.

Zur Desorption wurde mit steigenden Konzentrationen an Natriumchlorid gewaschen. Diese Desorption war jedoch unvollständig: Im Test mit 4:0-CoA wurde in allen vier Desorptionsschritten insgesamt 76 % der Gesamtaktivität wiedergefunden, mit 10:0-CoA nur 46 % (Abb. 24 A). Die DH I war also bei niedrigeren Salzkonzentrationen eluierbar als die DH III.

Der gleiche Versuch wurde mit DEAE-Cellulose (DE 52) wiederholt. Hier ließ sich mit denselben Salzkonzentrationen die

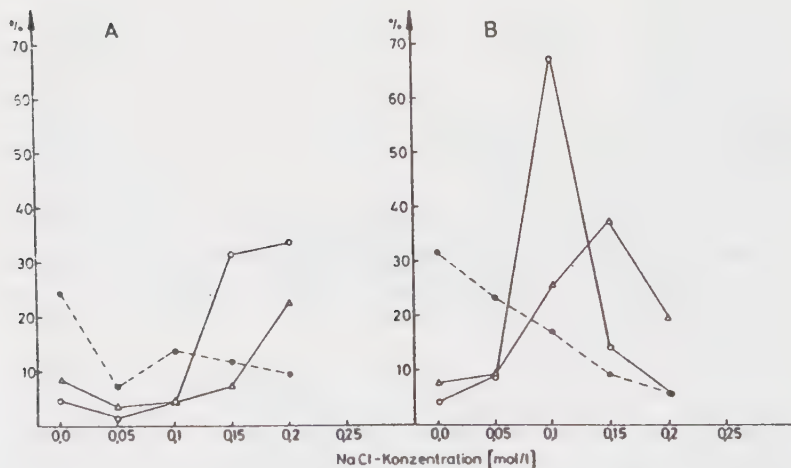


Abbildung 24: Verhalten der Acyl-CoA-Dehydrogenasen an Anionenaustauschern. Batchverfahren mit DEAE-Sephadex A-50 (A) und DEAE-Cellulose DE 52 (B). Die Desorption wurde durch steigende NaCl-Konzentrationen versucht. (●--●) Protein; Acyl-CoA-Dehydrogenase wurde bestimmt mit 4:0-CoA (○--○) und 10:0-CoA (▲--▲). Die auf der Ordinate aufgetragenen Prozentzahlen geben die wiedergefundene Menge Protein und die wiedergefundene Menge Enzymaktivität in den einzelnen Fraktionen an.

gesamte Enzymaktivität wieder eluieren. Auch in diesem Versuch wurden die mit unterschiedlichen Substraten gemessenen Aktivitätsmaxima in verschiedenen Fraktionen erhalten (Abb. 24 B).

Entsprechend den Ergebnissen aus den Batch-Versuchen wurde die Bindung und Elution der Acyl-CoA-Dehydrogenasen an Säulen mit DEAE-Sephadex und DEAE-Cellulose durchgeführt. Die Bindung erfolgte in Gegenwart niedriger Salzkonzentrationen. Andere β -Oxidationsenzyme wurden unter diesen Bedingungen nicht gebunden.

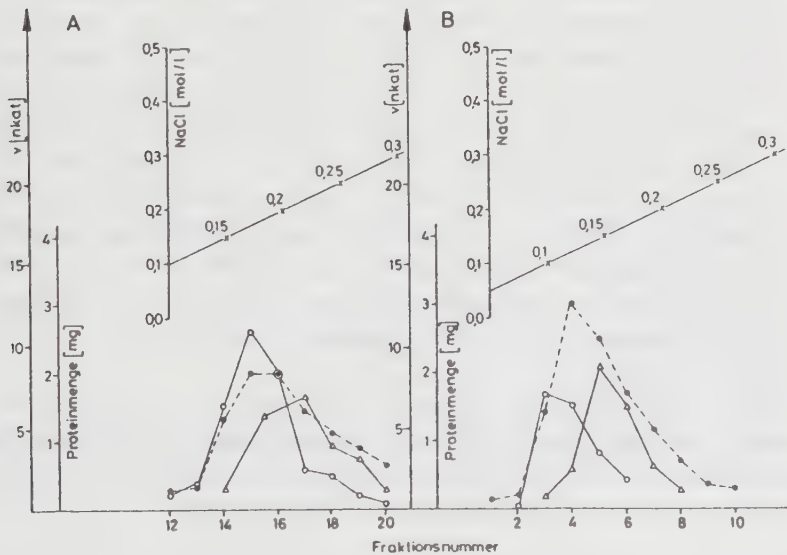


Abbildung 25: Verhalten der Acyl-CoA-Dehydrogenasen an Anionenaustauschersäulen. Gelmaterialien: DEAE-Sephadex A-50 (A) und DEAE-Cellulose DE 52 (B). Die Desorption erfolgte mit linearen kontinuierlichen NaCl-Gradienten. (●-●) Protein; Acyl-CoA-Dehydrogenasen wurden mit 4:0-CoA (○-○) und 10:0-CoA (Δ-Δ) bestimmt.

Es wurde mit linearen kontinuierlichen NaCl-Gradienten eluiert. Die Elution der Acyl-CoA-Dehydrogenasen von Sephadex A-50 erfolgte bei höheren Salzkonzentrationen als die Elution von DE 52. Die Trennung der Enzyme voneinander war mit DE 52 besser (Abb. 25).

3.3.4.4. Gelfiltration an Sephadex G-150

Zur Untersuchung der Eignung von Sephadex G-150 für die Reinigung von Acyl-CoA-Dehydrogenasen wurde eine Säule von 1,6 cm Durchmesser und 90 cm Höhe verwendet. Für größere Mengen an Rohextrakt (bis zu 3 g Protein) wurden Säulen mit 5 cm Durchmesser und 135 cm Höhe ausgetestet. Es wurde mit Geschwindigkeiten von 60 ml/h aufsteigend chromatographiert. Diese Säulen waren jedoch wegen der großen Gelhöhen und der mechanischen Labilität des Gelmateri als sehr empfindlich und verstopften schnell. Sie wurden durch Säulen von 10 cm Durchmesser und 85 cm Höhe ersetzt. Wegen der größeren Oberfläche (ca 80 cm² statt 20 cm²) konnte die Proteinlösung in einer schmalen Zone aufgegeben werden, so daß die Trennleistung trotz der geringeren Gelhöhe vergleichbar gut war.

Die große Oberfläche der Säule ließ sich mit Pumpe und Adaptor nicht gleichmäßig beladen. Daher wurde die Enzymlösung direkt auf die durch ein Nylonnetz stabilisierte Oberfläche aufgetragen und absteigend chromatographiert.

Das Elutionsprofil einer G-150-Säule ist in Abb. 26 dargestellt. Alle Acyl-CoA-Dehydrogenasen wurden gemeinsam eluiert. In den vereinigten Fraktionen waren noch 40 % des Proteins und 70 - 75 % der Acyl-CoA-Dehydrogenaseaktivitäten enthalten. Auch die anderen β -Oxidationsenzyme waren in diesem Pool vorhanden.

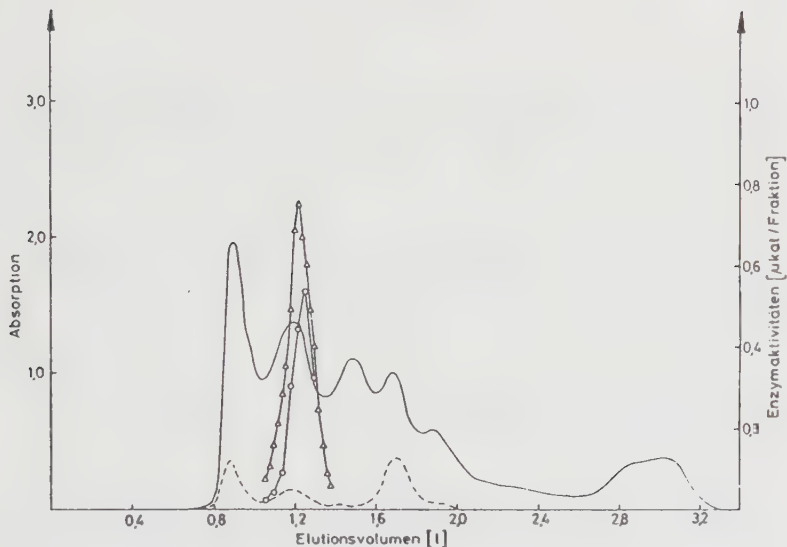


Abbildung 26: Gelchromatographie eines Rohextraktes an Sephadex G-150 (Säule 5 cm Ø x 1,35 m). Es wurden 3,1 g Protein aufgetragen. Die Absorption des Eluats wurde kontinuierlich bei 280 nm (—) und bei 435 nm (---) verfolgt. Acyl-CoA-Dehydrogenaseaktivität wurde mit 4:0-CoA (O—O) und 10:0-CoA (Δ—Δ) gemessen.

3.3.4.5. Präparative Elektrophorese

Die Auftrennung von Acyl-CoA-Dehydrogenasen durch präparative Elektrophorese wurde schon im Kapitel 3.2. (S. 51) beschrieben. Im Elektrophoresesystem nach Williams und Reisfeld (63, 64) wurde die DH III abgetrennt, die DH I und die DH II nur angetrennt. Die DH II wurde in relativ schlechten Ausbeuten wiedergewonnen.

3.3.4.6. Präparative Elektrofocussierung

Die Polyacrylamidgelelektrophorese trennt native Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Nettoladung und aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekulargewichte. In der Gelchromatographie ist die Trennung nur durch verschiedene Molekulargewichte bedingt. Da Acyl-CoA-Dehydrogenasen durch Gelchromatographie nicht aufgetrennt werden, wohl aber - mehr oder weniger gut - durch Elektrophorese, war zu vermuten, daß der Trenneffekt der Elektrophorese durch unterschiedliche Ladung der Proteine hervorgerufen wird. Diesen Ladungsunterschieden entsprechen verschiedene isoelektrische Punkte. Also bot sich das Verfahren der isoelektrischen Focussierung an.

Nach analytischer Elektrofocussierung eines Rohextraktes im Flachbett in einem pH-Gradienten von pH 3,5 bis pH 9,5 ließen sich die Acyl-CoA-Dehydrogenasen nicht eindeutig spezifisch anfärben. Eine andere analytische Methode stand nicht zur Verfügung.

Die präparative isoelektrische Focussierung wurde in einer Ampholinesäule versucht. Die Ergebnisse sind in Kap. 3.4.2. beschrieben.

Das Verfahren ist zur präparativen Trennung der Acyl-CoA-Dehydrogenasen ungeeignet.

3.3.5. Reinigungsverfahren

Die Enzymreinigung wurde begonnen mit der verbesserten Ammoniumsulfatfällung zur Abtrennung von Fremdproteinen (vgl. S. 61). Das durch Dialyse gelöste Sediment (40 - 70 % Sättigung) wurde zur weiteren Abtrennung anderer Proteine auf eine Sephadex G-150-Säule aufgetragen. Dies brachte zwei Vorteile:

1. Da durch die Ammoniumsulfatfällung 50 % des im Rohextrakt enthaltenen Proteins abgetrennt worden waren, konnte für die Enzymreinigung von der doppelten Menge Acetontrockenpulver ausgegangen werden, um die Kapazität der Sephadex G-150-Säule auszuschöpfen.
2. Ein weiterer Vorteil der vorangestellten Ammoniumsulfatfällung war die Abtrennung von Fett aus dem Rohextrakt. Die fettfreie Proteinlösung bewirkt eine Schonung des Gelmaterials.

Das praktische Problem, das Sediment der Ammoniumsulfatfällung in einem für die Gelchromatographie geeigneten kleinen Volumen aufzunehmen, wurde dadurch gelöst, daß das Sediment in nur wenig Puffer aufgeschlämmt wurde und die Suspension gegen große Mengen dieses Puffers dialysiert wurde. So wurde eine stark konzentrierte klare Proteinlösung erhalten, die in einer schmalen Zone auf die Sephadex G-150-Säule aufgebracht werden konnte.

Das Gelmaterial war in 0,05 mol HCl/l (pH 7,5) ohne irgendwelche Zusätze äquilibriert. Es wurde mit demselben Puffer eluiert. Durch die Gelfiltration konnten so die im Ammoniumsulfatsediment enthaltenen niedermolekularen Substanzen FAD, EDTA, DTE und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ abgetrennt werden. Dadurch wurde ein Dialyseschritt eingespart.

Nach Elution der Sephadex-Säule wurde in den Fraktionen die Acyl-CoA-Dehydrogenaseaktivität bestimmt (Abb. 27). Als Substrate wurden 4:0-CoA, 4c-10:1-CoA und 10:0-CoA angeboten. Die drei Aktivitätsgipfel sind geringfügig gegeneinander verschoben. Als erste erreicht die mit 4c-10:1-CoA gemessene DH II-Aktivität ein Maximum, als letzte die mit 4:0-CoA bestimmte DH I-Aktivität. Die Verschiebung beträgt nur einige Milliliter. Die Acyl-CoA-dehydrogenasehaltigen Fraktionen wurden vereinigt (G-150-Pool). Dazu wurden alle Fraktionen verwendet, in denen die Aktivität von mindestens einer Dehy-

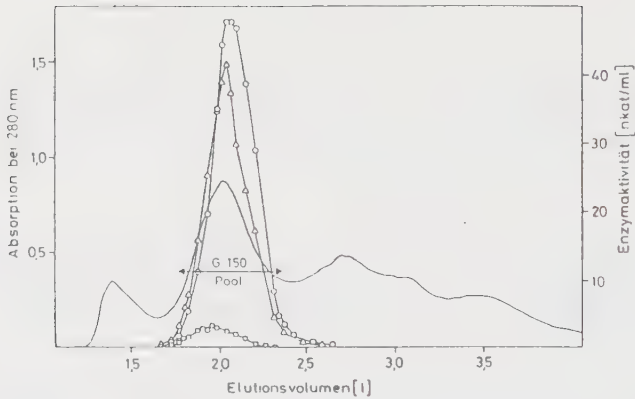


Abbildung 27: Reinigungsschritt II: Gelchromatographie des Ammoniumsulfatsediments (40 - 70 % Sättigung) an Sephadex G-150 (Säule 10 cm Ø x 85 cm). (—) Proteinabsorption bei 280 nm; Acyl-CoA-Dehydrogenaseaktivitäten wurden bestimmt mit 4:0-CoA (o—o), 4c-10:1-CoA (□—□) und 10:0-CoA (Δ—Δ). Fraktionen mit Enzymaktivität über 1 % (der aufgetragenen Menge) wurden zum G-150-Pool vereinigt.

drogenase 1 % der auf die Säule aufgetragenen Menge überstieg. Der G-150-Pool enthielt noch 18 % Protein und 50 - 60 % der Acyl-CoA-Dehydrogenaseaktivitäten (bezogen auf den Rohextrakt).

Im zweiten Teil des Reinigungsverfahrens wurde die Trennung der Acyl-CoA-Dehydrogenasen voneinander durchgeführt. Hier war der erste Schritt die Ionenaustauschchromatographie. Daran schloß sich für jedes Enzym eine präparative Elektrophorese an.

Zur Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose wurde DE 52 von Whatman verwendet. Dieses Material wird vorgequollen geliefert und ist mechanisch stabil. Das Packen der Säule ist

daher technisch einfach und gut reproduzierbar, ein wichtiger Punkt, da die Chromatographiebedingungen sehr genau dem Trennproblem angepaßt werden können und nach Optimierung entsprechend genau eingehalten werden müssen.

Bekanntlich erfolgt die Elution eines Proteins vom Ionenaustauscher bei großen Konzentrationsänderungen im Elutionspuffer sehr scharf und schnell, und sie geschieht umso langsamer, je flacher der Gradient oder je geringer beim diskontinuierlichen Gradienten die Differenz zwischen den einzelnen Konzentrationen der Elutionspuffer ist (90). Da die Desorption der Acyl-CoA-Dehydrogenasen durch relativ geringe Steigerungen der Salzkonzentration erfolgen mußte, war es zur Beschleunigung der Elution vorteilhaft, Säulen mit niedrigem Gelbett zu benutzen. Aufgrund der großen Substanzmengen waren große Gelvolumina notwendig, dementsprechend wurden kurze dicke Säulen verwendet. Ebenso wurde während der Optimierung des Verfahrens beim Übertragen ausgetesteter Bedingungen auf größere Maßstäbe nicht die Säulenhöhe sondern der Querschnitt verändert, denn bei Änderung der Höhe hätten trotz ansonsten identischer Bedingungen ganz andere Resultate erhalten werden können.

Ionenaustauscher sollen mit Puffern geringer Ionenstärke betrieben werden, um eine möglichst hohe Bindungskapazität zu erhalten (68). Daher wurde Tris-HCl-Puffer für diesen Schritt und auch für die gesamte Reinigung gewählt. Die Änderung der Ionenstärke wurde durch NaCl-Zusatz erreicht.

Mit Puffer (0,05 mol Tris-HCl/l, pH 7,5) ohne NaCl binden alle drei Acyl-CoA-Dehydrogenasen an das Gel. Nach Zusatz von 0,03 mol NaCl/l wird eine große Menge Protein eluiert, nicht jedoch die Acyl-CoA-Dehydrogenasen. Diese beiden Schritte wurden zu einem zusammengefaßt: DE 52 wurde in Puffer mit 0,03 mol NaCl/l äquilibriert. Der aufzutragenden Proteinlösung wurden 0,03 mol NaCl/l zugesetzt. Nach dem Auftragen wurde mit demselben Puffer gespült, bis kein Protein mehr

eluiert wurde. So wurde erreicht, daß 50 - 60 % des Proteins die Säule direkt passieren. Auch die anderen β -Oxidationsenzyme werden in diesem Eluat gefunden, während die Acyl-CoA-Dehydrogenasen gebunden werden.

Die Bindung an die Ionenaustauschersäule erfolgt unabhängig vom Probenvolumen, so daß der G-150-Pool ohne Konzentrierung aufgetragen werden konnte.

Zur getrennten Elution der Acyl-CoA-Dehydrogenasen vom Ionenaustauscher wurde ein diskontinuierlicher NaCl-Gradient entwickelt. Die einzelnen NaCl-Konzentrationen wurden so gewählt, daß sie die unteren Grenzen derjenigen Konzentrationen darstellen, die zum Eluieren der jeweiligen Acyl-CoA-Dehydrogenasen notwendig sind. Dadurch erfolgte die Elution nur sehr langsam.

Die Acyl-CoA-Dehydrogenasen wurden folgendermaßen eluiert (Abb. 28): DH I mit 0,055 mol NaCl/l; DH II mit 0,09 mol NaCl/l; DH III mit 0,16 mol NaCl/l. Zwischen diesen Elutionen wurden zwei weitere Schritte mit 0,06 und 0,105 mol NaCl/l geschaltet. Sie dienten der Kontrolle, ob in der vorhergehenden Fraktion ausreichend eluiert worden war. Im Normalfall enthielten diese Kontrollen kaum Enzymaktivität und wurden verworfen.

Die Elutionsbedingungen und die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefaßt. Es ist ersichtlich, daß die so gewonnenen Acyl-CoA-Dehydrogenasen noch nicht vollständig voneinander getrennt waren:

DH I war noch geringfügig mit DH II verunreinigt: mit 4:O-CoA (dem Substrat für DH I und DH II) wurden 9.000 nkat gemessen, mit 4c-10:1-CoA (dem spezifischen Substrat für DH II) noch 83 nkat ($\hat{=}$ 0,9 %).

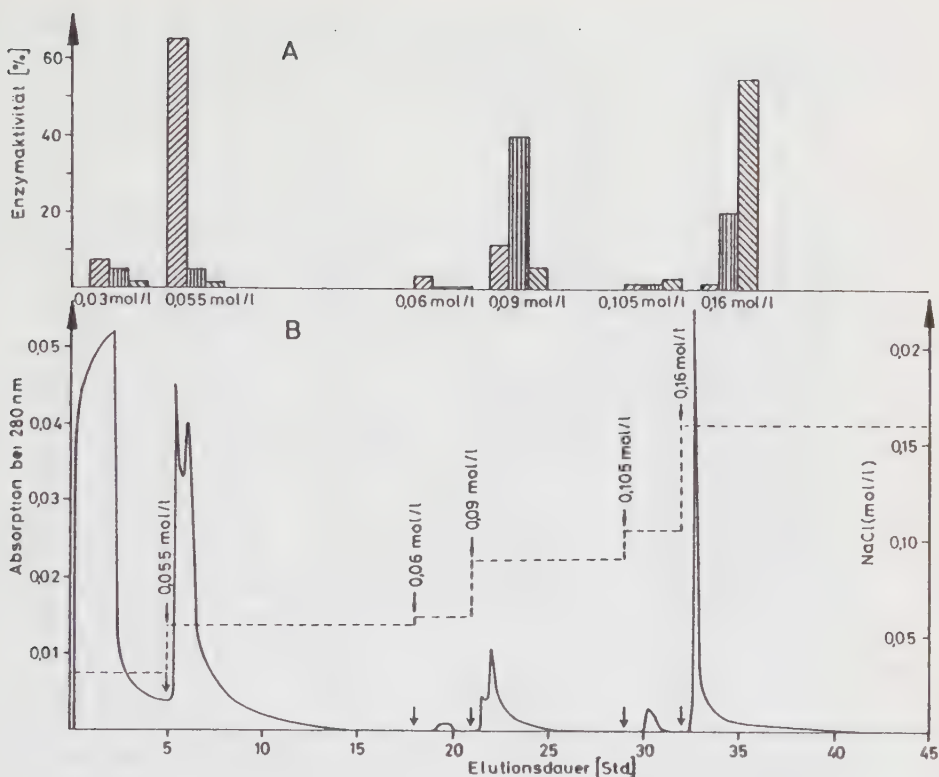


Abbildung 28: Reinigungsschritt III: Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose (DE 52). Es wurde eine Säule von 2,6 cm Ø und 12 cm Höhe benutzt. Die getrennte Desorption der Acyl-CoA-Dehydrogenasen wurde durch einen diskontinuierlichen NaCl-Gradienten erreicht.

- A Acyl-CoA-Dehydrogenaseaktivitäten in den einzelnen Fraktionen, mit 4:0-CoA (▨), 4c-10:1-CoA (▩) und 10:0-CoA (▤) bestimmt als % der auf die Säule aufgetragenen Enzymaktivität.
- B Elutionsprofil bei 280 nm (—) und diskontinuierlicher NaCl-Gradient (---).

Tabelle 6: Reinigungsschritt III: Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose (DE 52).
Der G-150-Pool wurde mit 30 mmol NaCl/l versetzt. Die Enzymaktivitäten in diesem Pool wurden gleich 100 % gesetzt. Enzymaktivitäten wurden mit drei Substraten bestimmt: 4:0-CoA (= Aktivität von DH I und DH II); 4c-10:1-CoA (= Aktivität von DH II und DH III); 10:0-CoA (= Aktivität von DH II und DH III)

Vorgang	Durchflußge- schwindigkeit [ml/h]	NaCl-Kon- zentration [mmol/l]	Elutions- dauer [h]	Elutions- volumen [ml]	wiedergewonnene Acyl-CoA- Dehydrogenaseaktivität [%]	
					Substrat: 4:0-CoA	Substrat: 4c-10:1-CoA 10:0-CoA
Beladen	400	30	1,25	500	12	5 2
Spülen	200	30	2,5	500		
Eluieren						
Frakt. 1	100	55	12	1200	57	5 2
Frakt. 1a	100	60	2	200	4	0,5 1
Frakt. 2	100	90	8	800	8	40 8
Frakt. 2a	100	105	2	200	1	1 2
Frakt. 3	100	160	12	1200	2	22 58

DH III enthielt ebenfalls noch Reste von DH II: mit 10:0-CoA (dem Substrat für DH III und DH II) wurde eine Aktivität von 11.000 nkat bestimmt, mit 4c-10:1-CoA eine Aktivität von 380 nkat ($\hat{=}$ 3,5 %).

Dagegen war die Fraktion, die die angereicherte DH II enthielt, wesentlich stärker verunreinigt. Da sie die mittlere der durch Ionenaustauschchromatographie gewonnenen Fraktionen ist, enthielt sie sowohl DH I als auch DH III. DH II ist zudem die Acyl-CoA-Dehydrogenase mit der geringsten spezifischen Aktivität (im Rohextrakt nur etwa ein Zehntel im Vergleich mit den beiden anderen Acyl-CoA-Dehydrogenasen). Die mit 0,09 mol NaCl/l eluierte Fraktion enthielt daher noch ungefähr gleich große Aktivitäten aller Dehydrogenasen: im Test mit 4:0-CoA (DH I und DH II) 1.300 nkat, mit 4c-10:1-CoA (DH II) 700 nkat und mit 10:0-CoA (DH II und DH III) 1.500 nkat. Das entspricht, verglichen mit dem Rohextrakt, einer zehnfachen Anreicherung der DH II gegenüber den Dehydrogenasen DH I und DH III.

Bedingt durch die langsame Elution der Acyl-CoA-Dehydrogenasen wurden große Elutionsvolumina erhalten. Bei Konzentrierung durch Fällern mit festem Ammoniumsulfat traten Aktivitätsverluste von ca 50 % auf. Die Fällung mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung (3,8 mol/l) war bei den großen Volumina nicht durchführbar. Durch Ultrafiltration ergaben sich ebenfalls Verluste von 50 %. Im Ultrafiltrat wurde keine Aktivität beobachtet. Die Ausbeuten konnten jedoch auf ca 80 % gesteigert werden, wenn vorm Einengen FAD und EDTA zugesetzt wurden.

Um Fraktionen zu erhalten, in denen die Acyl-CoA-Dehydrogenasen vollständig voneinander getrennt waren, wurde als weiterer Reinigungsschritt für jede Fraktion der Ionenaustauschchromatographie eine präparative Elektrophorese angeschlossen.

Als Vorbereitung zur Elektrophorese mußte zunächst gegen verdünnten Sammelgelpuffer dialysiert werden. Da der Puffer einen

pH-Wert von 5,5 hat, stellte diese Dialyse zugleich eine Säurefällung dar . Dadurch wurde nochmals Fremdprotein abgetrennt.

Die Trennung der DH I und DH II durch Elektrophorese war schwierig, da die R_F -Werte dieser beiden Dehydrogenasen sehr nahe beieinanderliegen (vgl. S. 50). Daß die DH I aus der Fraktion 1 des Ionenaustauschers (0,055 mol NaCl/l) trotzdem durch diese Methode erfolgreich zu reinigen war, ergab sich aus folgenden günstigen Umständen:

1. Die DH II-Aktivität war in dieser Fraktion einhundertmal kleiner als die der DH I .
2. Die DH II war gegen die Elektrophoresebedingungen empfindlicher als die DH I.

Daher ließ sich nach Durchführung der präparativen Elektrophorese die DH II-Aktivität nicht mehr nachweisen (Abb. 29 A).

Bei der Reinigung der DH II lagen die Verhältnisse wesentlich ungünstiger: Die Fraktion 2 vom Ionenaustauscher (0,09 mol NaCl/l) enthielt ungefähr gleiche Mengen DH I und DH II. Um die Trennung zu verbessern, erfolgte die Elution während der präparativen Elektrophorese mit einem Saccharose-Dichtegradienten. Dadurch wurde die Durchmischung in der Elutionskammer verhindert. Außerdem wurde zum Schutz der empfindlichen DH II dem Gel und dem Elutionspuffer FAD und EDTA zugesetzt. So wurden zwei etwa gleich große sich überschneidende Aktivitätsgipfel erhalten (Abb. 29 B). In der zweiten Hälfte des Aktivitätsgipfels der DH II waren die Fraktionen frei von DH I. Das ist aus Abbildung 29 B nicht ersichtlich, läßt sich aber sowohl durch spezifische Anfärbung des nativen Proteins als auch durch Proteinfärbung des mit SDS denaturierten Proteins nach Polyacrylamidgelelektrophorese zeigen (Abb. 30, S. 79 und Abb. 31, S. 80).

Die Trennung der DH II von der DH III erfolgte wegen der un-

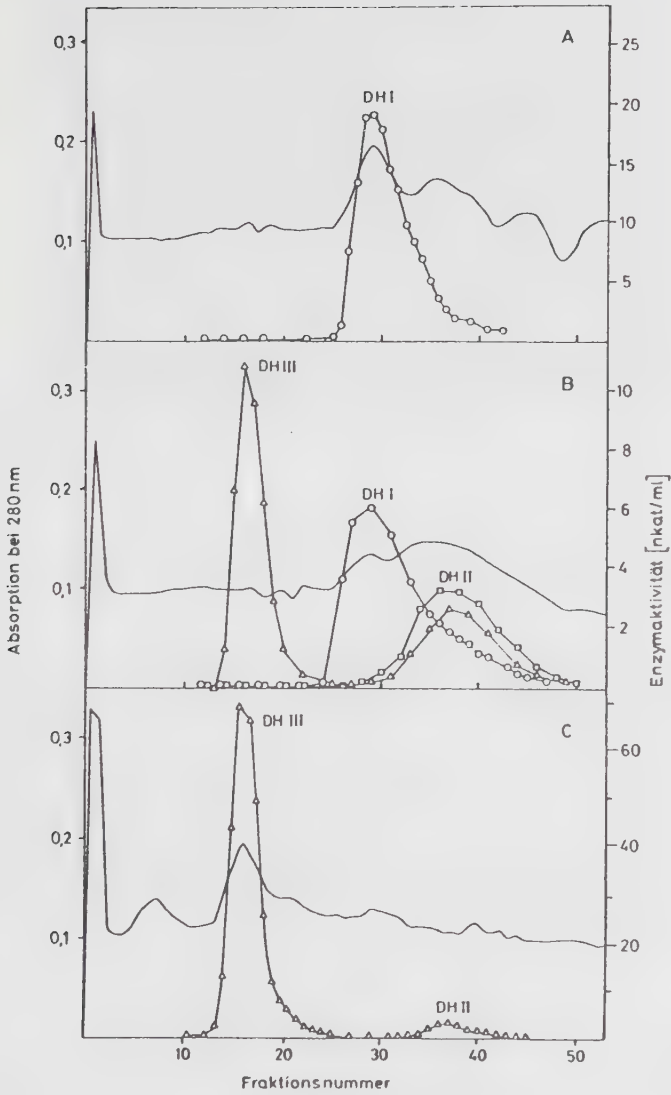


Abbildung 29

Abbildung 29: Reinigungsschritt IV: Präparative Elektrophoresen. Die durch Ionenaustauschchromatographie getrennten Acyl-CoA-Dehydrogenasen wurden durch präparative Elektrophoresen im Polyacrylamidgelsystem nach Williams und Reisfeld (63,64) nachgereinigt.

A Fraktion 1 der DEAE-Cellulosesäule (0,055 mol NaCl/l) → DH I

B Fraktion 2 (0,09 mol NaCl/l) → DH II

C Fraktion 3 (0,16 mol NaCl/l) → DH III

Enzymaktivitäten wurden bestimmt mit 4:0-CoA (o—o), 4c-10:1-CoA (□—□) und 10:1-CoA (Δ—Δ).
(—) Elutionsprofil, bei 280 nm gemessen

verschiedlichen R_F -Werte quantitativ in beiden vom Ionenaustauscher erhaltenen Fraktionen 2 und 3 (Abb. 29 B und C).

Die Spitzenfraktionen der Aktivitätsgipfel waren weitestgehend frei von Fremdprotein (Abb. 31, S.80). Die Acyl-CoA-Dehydrogenaseaktivität enthaltenden Fraktionen wurden nicht vereinigt. Nur die Spitzenfraktionen wurden in Untersuchungen zur Charakterisierung der Acyl-CoA-Dehydrogenasen verwendet.

In der Tabelle 7 (S. 81) ist die Reinigung und Trennung der Acyl-CoA-Dehydrogenasen zusammengefaßt. Die Abtrennung der anderen β -Oxidationsenzyme geht aus Tabelle 8 (S. 82) hervor.

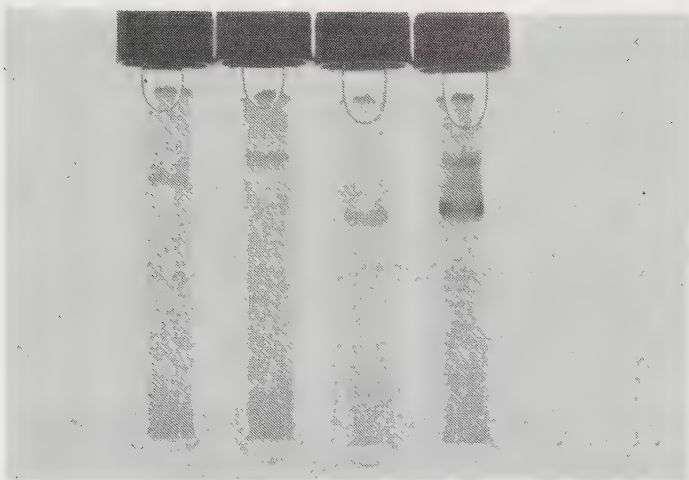


Abbildung 30: Spezifische Anfärbung der Acyl-CoA-Dehydrogenasen im Polyacrylamidgel nach Williams und Reisfeld (63,64). Die Färbetechnik ist in Kap. 2.2.3.2., S. 15 beschrieben. Als Substrate wurden verwendet: 4:0-CoA für DH I (Gel a), 4c-10:1-CoA für DH II (Gel b), 10:0-CoA für DH III (Gel c) und 4:0-CoA + 10:0-CoA für die Mischung von DH I, DH II und DH III (Gel d).

Abbildung 31: Reinigungsschema für die Acyl-CoA-Dehydrogenasen der Rinderleber und Kontrolle der Proteinabtrennung durch SDS-Gelelektrophorese (65) auf allen Reinigungsstufen. Folgende Reinigungsschritte wurden durchgeführt:

- ① Trockenpulverextraktion
- ② Ammoniumsulfatfällung (40 - 70 %-Sediment)
- ③ Gelchromatographie an Sephadex G-150
- ④ Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose, Eluate mit ④a 0,055 mol NaCl/l;
④b 0,09 mol NaCl/l; 0,16 mol NaCl/l ④c
- ⑤a , ⑤b , ⑤c Präparative Elektrophoresen

Rinderlebermitochondrien
Acetontrockenpulver

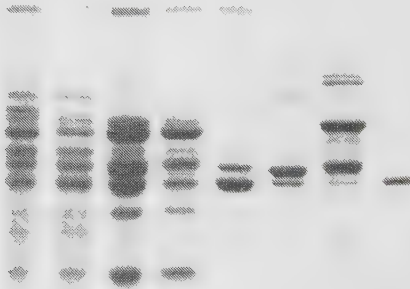
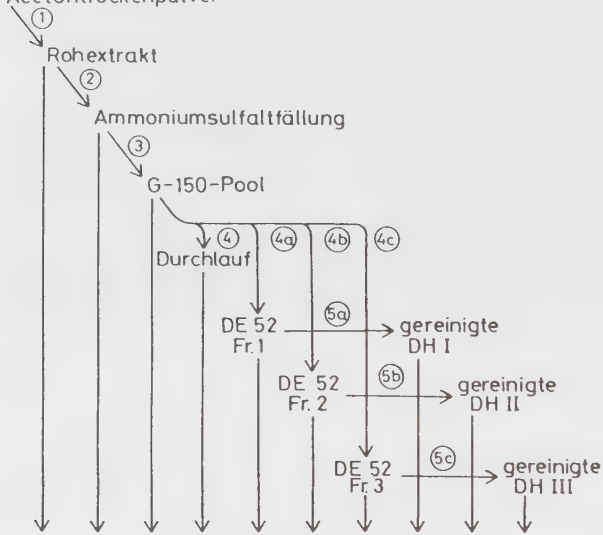


Abbildung 31

Tabelle 7: Übersicht über die Reinigung der drei Acyl-CoA-Dehydrogenasen der Rinderleber

Fraktion	Gesamtprotein mg	A c y l - C o A - D e h y d r o g e n a s e a k t i v i t ä t									
		Substrat = 4:0-CoA			Substrat = 4c-10:1-CoA			Substrat = 10:0-CoA			
		nkat mg	%	Anreicherung	nkat mg	%	Anreicherung	nkat mg	%	Anreicherung	
Robextrakt	7.500	3,55	26.700	100	1	0,445	3.330	100	1	4,45	33.300
(NH ₄) ₂ SO ₄ -Sediment (40-70%)	3.750	5,68	21.300	80	1,6	0,712	2.660	80	1,6	7,11	26.600
G-150-Pool	1.350	11,9	16.000	60	3,3	1,23	1.670	50	2,8	13,6	18.330
DE 52-Säule											
30 mmol NaCl/l	750	2,5	1.880	7	0,7	0,222	83,3	2,5	0,5	0,45	330
55 mmol ^{a)} NaCl/l	120	75	9.000	34	21	1,39	83,3	2,5	3,1	1,38	167
90 mmol ^{b)} NaCl/l	45	29,7	1.300	5	8,4	14,9	677	20	33	33,3	1.500
160 mmol ^{c)} NaCl	60	4,45	266	1	1,3	6,34	384	11	14	187	10.700
Präparative Elektrophoresen		298		84		17,40		40		541	

a) Diese Fraktion wurde zur Reinigung der DH I durch präparative Elektrophorese verwendet.

b) Diese Fraktion wurde zur Reinigung der DH II durch präparative Elektrophorese verwendet.

c) Diese Fraktion wurde zur Reinigung der DH III durch präparative Elektrophorese verwendet.

d) Die Fraktionen der präparativen Elektrophorese wurden nicht vereinigt. Daher konnte hier nur die spezifische Aktivität und der Anreicherungsfaktor für die Spitzenfraktionen angegeben werden.

Tabelle 8: Abtrennung anderer β -Oxidationsenzyme während der Reinigung von Acyl-CoA-Dehydrogenasen

Fraktion	Protein (%)	Enoyl-CoA- Hydratase- aktivität (%)	β -Hydroxy- Acyl-CoA-De- hydrogenase- aktivität(%)	Acetacetyl- CoA-Thiolase- aktivität (%)
Rohextrakt	100	100	100	100
70%(NH ₄) ₂ SO ₄ - Sediment	50	44	81	100
G-150-Pool	18	39	15	83
DE 52-Säule:				
30 mmol NaCl/l	10	31	12	62
55 mmol NaCl/l	1,6	0,16	1,2	0,06
90 mmol NaCl/l	0,6	0,01	0,01	0,01
160 mmol NaCl/l	0,8	0,01	0,01	0,01

3.3.6. Abhängigkeit der Reinheit der Acyl-CoA-Dehydrogenasen von der Qualität des Aceton-trockenpulvers

Die Reinheit der getrennten Acyl-CoA-Dehydrogenasen war abhängig von der Qualität des Trockenpulvers. Während die Ausbeuten an Trockenpulver pro kg Leber konstant waren (20 g/kg) und Rohextrakte aus gleichem Trockenpulver konstante spezifische Aktivitäten hatten, variierte die Qualität der Trockenpulver, so daß die spezifischen Aktivitäten der Acyl-CoA-Dehydrogenasen in Rohextrakten verschiedener Chargen Trockenpulver unterschiedlich waren.

Aus Trockenpulvern mit besonders niedrigen Aktivitäten kann-

ten keine reinen Acyl-CoA-Dehydrogenasen erhalten werden. Solche Enzymfraktionen konnten durch Chromatographie an Sephadex G-200 nachgereinigt werden. Für einige der zur Charakterisierung der einzelnen Enzyme notwendigen Bestimmungen reichte die Abtrennung der Acyl-CoA-Dehydrogenasen voneinander.

Acyl-CoA-Dehydrogenasen aus guten Trockenpulvern zeigten im nativen Zustand und auch nach SDS-Denaturierung im Polyacrylamidgel eine Bande.

3.4. Charakterisierung der gereinigten Acyl-CoA-Dehydrogenasen

Zur Charakterisierung der Acyl-CoA-Dehydrogenasen wurden Molekulargewichte, isoelektrische Punkte und pH- und Temperaturoptima bestimmt.

3.4.1. Molekulargewichtsbestimmungen

Bestimmung der Molekulargewichte der Untereinheiten

Die Molekulargewichte der Acyl-CoA-Dehydrogenase-Untereinheiten wurde nach Behandlung der Enzyme mit SDS durch Vergleich mit Eichproteinen im Polyacrylamidgel nach Lämmli ermittelt (65). Als Eichsubstanzen wurden verwendet: Chymotrypsinogen (25 000), Lactat-Dehydrogenase-Untereinheit (35 000), Aldolase-Untereinheit (36 750), Ov-Albumin (45 000) und Rinderserumalbumin (67 000). Jede Acyl-CoA-Dehydrogenase zeigte eine Bande (Abb. 32), ist also aus identischen Untereinheiten aufgebaut. Die Molekulargewichte wurden aus fünf Eichgelen ermittelt. Die errechnete Fehlerbreite lag bei 3,6 %. Folgende Molekulargewichte wurden erhalten: DH I: $40\,300 \pm 1400$, DH II: $43\,300 \pm 1500$, DH III: $45\,200 \pm 1600$ (Abb. 33).

Bestimmung der Molekulargewichte der nativen Enzyme

Die Molekulargewichte der nativen Proteine wurden in einem Polyacrylamid-Dichtegradientengel (4 - 30 %) bestimmt. Als Eichproteine wurden Rinderserumalbumin (67 000), Lactat-Dehydrogenase (140 000) und Catalase (232 000) benutzt. Die Molekulargewichte wurden aus sechs Eichgelen ermittelt (Abb. 34). Dabei wurde zur Errechnung der R_F -Werte die Laufstrecke des Rinderserumalbumins gleich 1,0 gesetzt. Es wurde für die R_F -Werte eine Fehlerbreite von 1 % errechnet. Das entspricht einem Fehler von ungefähr 3 % in der Molekulargewichtsbestimmung. Folgende Werte wurden erhalten: DH I: $188\,150 \pm 5650$, DH II: $205\,500 \pm 5500$, DH III: $172\,400 \pm 5600$ (Abb. 35).

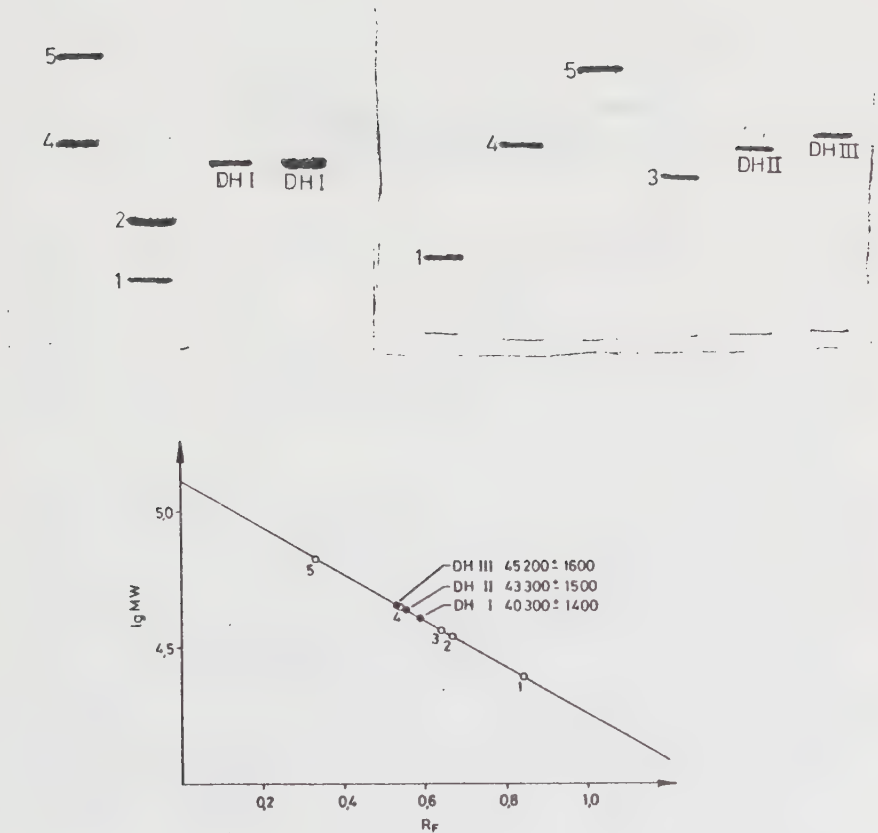


Abbildung 32 und 33:

Molekulargewichtsbestimmung der Untereinheiten im SDS-Gel (Acrylamidkonzentration = 10 %) nach Lämmli (65). Eichproteine sind: 1: Chymotrypsinogen (25 000), 2: LDH-Untereinheit (35 000), 3: Aldolase-Untereinheit (36 750), 4: Ov-Albumin (45 000) und 5: Rinderserumalbumin (67 000).

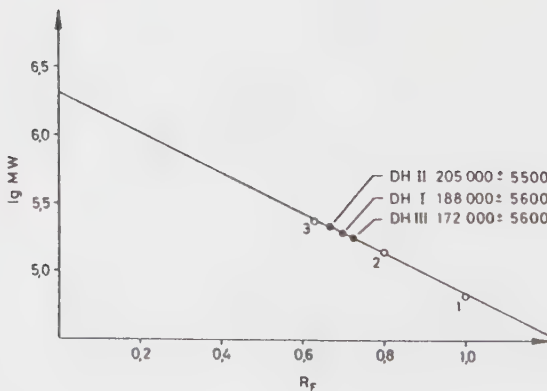
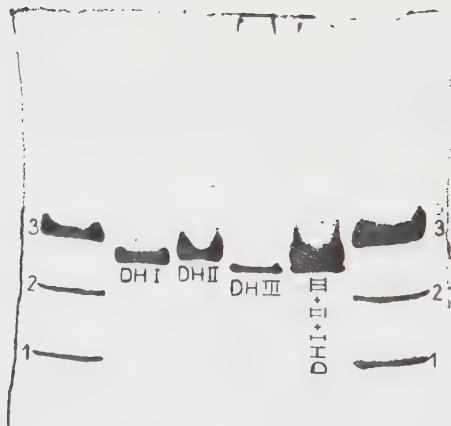


Abbildung 34 und 35:

Molekulargewichtsbestimmung der nativen Enzyme im Polyacrylamid-Dichtegradientengel PAA 4/30 (4 - 30 %). Als Eichproteine wurden benutzt: 1: Rinderserumalbumin (67 000), 2: Lactat-Dehydrogenase (140 000) und 3: Catalase (232 000).

3.4.2. Bestimmung der isoelektrischen Punkte

Zu Beginn der Arbeit war untersucht worden, ob die Acyl-CoA-Dehydrogenasen durch Elektrofocussierung auftrennbar sind und ob dieses Verfahren präparativ zur Trennung einsetzbar ist (Kap. 3.3.4.6., S. 68). Nach Elektrofocussierung im Flachbett in einem pH-Gradienten von 3,5 bis 9,5 hatte die spezifische Anfärbung sehr breit verschmierte Banden ergeben, eine Auftrennung war nicht erkennbar. Es war aber daraus zu entnehmen, daß die isoelektrischen Punkte im pH-Bereich zwischen 5 und 6 liegen mußten.

Zur präparativen Trennung wurde eine Ampholinesäule mit einem pH-Gradienten von 4 bis 7 benutzt (Abb. 36 B). Mit dem Substrat 10:0-CoA wurden zwei Aktivitätsmaxima erhalten (pH 5,05 und pH 5,50), mit 4:0-CoA drei Maxima (pH 5,19, pH 5,50 und pH 5,87). Die Banden waren jedoch breit, so daß eine präparative Trennung der Acyl-CoA-Dehydrogenasen nicht möglich war.

Als die reinen Enzyme vorlagen, wurde die Bestimmung der isoelektrischen Punkte im analytischen Maßstab nochmals durchgeführt. Das verwendete Polyacrylamidgel enthielt einen pH-Gradienten von 4 bis 7. Die spezifische Anfärbung ergab nur breit verschmierte Zonen, die eventuell auf eine Reaktion der Elektronenakzeptoren mit den verwendeten Ampholyten zurückzuführen sind. Auch durch langes Wässern vor der Färbung konnte das Ergebnis nicht verbessert werden. Daher wurden die Acyl-CoA-Dehydrogenasen mit Coomassie Brilliant Blue R 250 angefärbt (Abb. 36 A).

Obwohl die Dehydrogenasen im SDS-Gel und im Polyacrylamid-Dichtegradientengel nur eine Bande gezeigt hatten, wurden im pH-Gradientengel für DH I zwei Banden und für DH III sogar drei Banden erhalten. Die DH II ergab eine Bande.

Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit den Resultaten der Elektrofocussierung in der Ampholinesäule (Abb. 36) ergab:

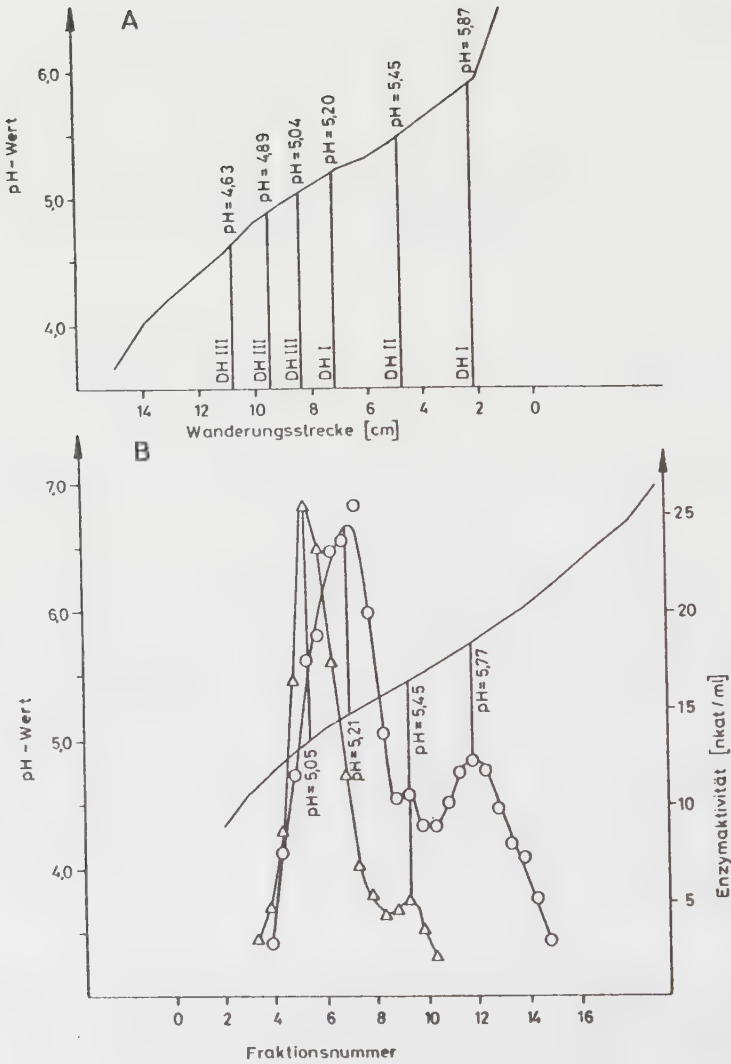


Abbildung 36

Abbildung 36: Isoelektrische Focussierung im Polyacrylamidgel (A) und in der Ampholinesäule (B). Es wurde für beide Systeme ein pH-Gradient von 4 - 7 verwendet (—). Im Polyacrylamidgel wurden die isoelektrischen Punkte durch Proteinfärbung der gereinigten Acyl-CoA-Dehydrogenasen ermittelt. Nach Trennung in der Ampholinesäule wurden im Eluat Acyl-CoA-Dehydrogenaseaktivitäten mit 4:O-CoA (O—O) und 10:O-CoA (Δ—Δ) ermittelt. Die experimentellen Einzelheiten sind in den Kapiteln 2.2.4.2. und 2.5.6. beschrieben.

Die DH II-Bande bei pH 5,4 bis 5,5 entspricht dem Aktivitätsmaximum, das sowohl mit 4:O-CoA als auch mit 10:O-CoA nach Focussierung in der Ampholinesäule bei pH-Wert 5,5 erhalten wurde. Die beiden DH I -Banden bei pH 5,2 und pH 5,87 entsprechen den beiden anderen mit 4:O-CoA gefundenen Maxima (pH 5,19 und pH 5,77). Auch die DH III-Bande bei pH 5,05 liegt entsprechend (Säule: 5,05). Die beiden anderen DH III-Banden wurden nach Focussierung in der Ampholinesäule nicht gefunden. Ob sie durch mit anderen Methoden nicht abtrennbares Fremdprotein entstanden sind oder ob sie DH III mit anderer Nettoladung darstellen, konnte nicht geklärt werden.

3.4.3. pH- und Temperaturabhängigkeit der Acyl-CoA-Dehydrogenasen

Im Rahmen der Untersuchungen zum Acyl-CoA-Dehydrogenasetest waren Messungen über pH- und Temperaturabhängigkeit in Rohextrakten durchgeführt worden. Da in diesen Lösungen die Differenzierung der Acyl-CoA-Dehydrogenasen nicht möglich war und eine Überlagerung von Effekten nicht ausgeschlossen werden konnte, wurden die Bestimmungen mit den gereinigten Enzymen wiederholt.

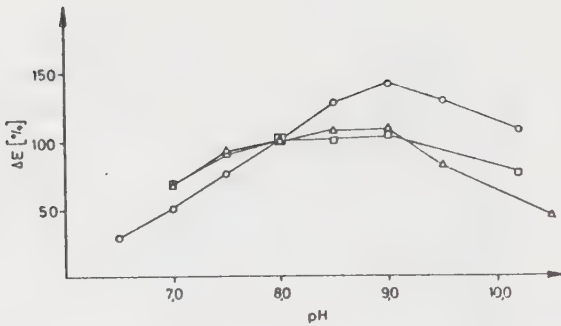


Abbildung 37: pH-Abhängigkeit der Acyl-CoA-Dehydrogenase-reaktionen. (O—O) DH I, mit 4:0-CoA gemessen; (□—□) DH II, mit 4c-10:1-CoA gemessen; (Δ—Δ) DH III, mit 10:0-CoA gemessen. Der unter normalen Testbedingungen (pH 8,0, vgl. Tab. 2, S. 44) erhaltene Wert wurde gleich 100 % gesetzt.

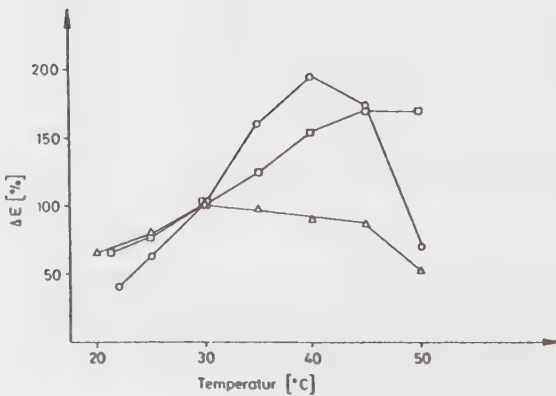


Abbildung 38

Abbildung 38: Temperaturabhängigkeit der Acyl-CoA-Dehydrogenasereaktionen. (o—o)DH I, mit 4:0-CoA gemessen; (□—□)DH II, mit 4c-10:1-CoA gemessen; (Δ—Δ) DH III, mit 10:0-CoA gemessen. Der unter normalen Testbedingungen (30°C, vgl. Tab.2, S. 44) erhaltene Wert wurde gleich 100 % gesetzt.

Während die pH-Abhängigkeit für alle Enzyme ungefähr gleich ist und gut mit der im Rohextrakt ermittelten Kurve übereinstimmt (Abb. 12, S. 42 und Abb. 37), wurden für die Temperaturabhängigkeit aller Acyl-CoA-Dehydrogenasen Kurven mit beträchtlich verschobenen Maxima erhalten. (Abb. 11, S. 42 und Abb. 38). Die DH III hat ein sehr flaches, breites Maximum bei 30 - 45°C, die DH I ein recht scharfes Maximum bei 40°C und die DH II ein Maximum bei 45 - 50°C (Abb. 38). Die mit Rohextrakt erhaltene Kurve (Substrat = 10:0-CoA) mit einem Maximum bei 30°C (Abb. 11) ist vielleicht dadurch zu erklären, daß bei höheren Temperaturen viele Proteine des Rohextrakts denaturieren. Das präzipitierende Protein kann Acyl-CoA-Dehydrogenasen, Acyl-CoA-Ester und Elektronenakzeptoren mit ausfällen und dadurch eine starke Herabsetzung der Konzentrationen in der Meßküvette bewirken, die eine Aktivitätsabnahme mit steigender Temperatur vortäuscht.

3.5. Substratspezifität der Acyl-CoA-Dehydrogenasen

In Acyl-CoA-Dehydrogenasereaktionen folgt der Substratumsatz der Michaelis-Menten-Kinetik. Eine Hemmung durch hohe Substratkonzentrationen ($[S] = 30 - 50 \text{ mal} > K_M$) ist nicht zu beobachten. Beispiele sind in Abbildung 39 gegeben.

3.5.1. Gesättigte Acyl-CoA-Ester

K_M - und $V_{\max}$ -Werte für den Umsatz gesättigter Substrate sind in Tabelle 9 zusammengefaßt.

Tabelle 9: K_M - und $V_{\max}$ -Werte der Acyl-CoA-Dehydrogenasen aus Rinderleber für gesättigte Acyl-CoA-Ester

Acyl-CoA-Ester	Dehydrogenase I		Dehydrogenase II		Dehydrogenase III	
	K_M mol/l	$V_{\max}^*$ nkat/mg	K_M mol/l	$V_{\max}^*$ nkat/mg	K_M mol/l	$V_{\max}^*$ nkat/mg
4:0	$0,9 \cdot 10^{-5}$	300	$8,4 \cdot 10^{-6}$	17,5	-	-
6:0	$2,0 \cdot 10^{-5}$	155	$5,5 \cdot 10^{-6}$	25,0	$5,5 \cdot 10^{-4}$	158
8:0	$3,2 \cdot 10^{-5}$	43	$3,2 \cdot 10^{-6}$	18,3	$2,3 \cdot 10^{-4}$	325
10:0	-	-	$2,9 \cdot 10^{-6}$	17,4	$1,3 \cdot 10^{-4}$	525
12:0	-	-	$4,3 \cdot 10^{-6}$	11,2	$2,0 \cdot 10^{-4}$	895
14:0	-	-	$5,7 \cdot 10^{-6}$	7,5	$3,8 \cdot 10^{-4}$	466
16:0	-	-	$4,0 \cdot 10^{-6}$	3,8	$7,8 \cdot 10^{-4}$	242
18:0	-	-	$11,6 \cdot 10^{-6}$	1,0	$2,9 \cdot 10^{-4}$	125

* Die $V_{\max}$ -Werte geben die spezifischen Aktivitäten der gereinigten Acyl-CoA-Dehydrogenasen an.

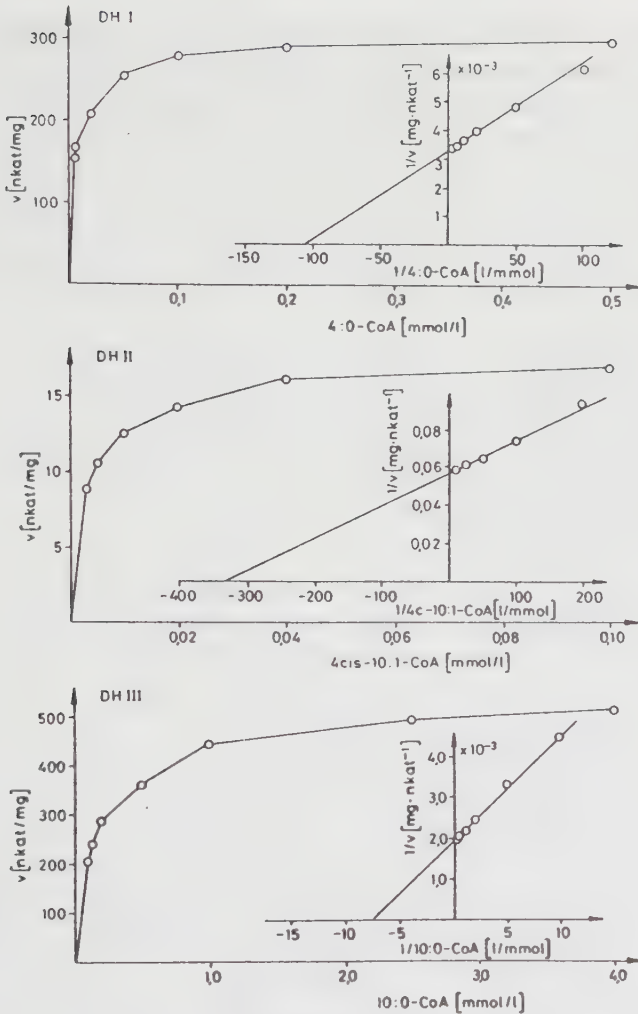


Abbildung 39: Beispiele für den Substratumsatz durch Acyl-CoA-Dehydrogenasen. Die Auftragung erfolgte nach Michaelis-Menten und nach Lineweaver-Burk.

oben: Umsatz von 4:0-CoA durch DH I

Mitte: Umsatz von 4c:10:1-CoA durch DH II

unten: Umsatz von 10:0-CoA durch DH III

Trägt man die Maximalgeschwindigkeiten der Acyl-CoA-Dehydrogenasereaktionen in Abhängigkeit von der Kettenlänge der Substrate auf (Abb. 40), so erhält man ein Bild, das dem von den Schweineleberenzymen bekannten ungefähr entspricht (Abb. 20, S. 52). Die kurzkettige Fettsäuren oxidierende DH I hat mit zunehmender Kettenlänge der Substrate sinkende Maximalgeschwindigkeiten. DH II und DH III, die auch langkettige Fettsäuren umsetzen, haben ein Aktivitätsmaximum gegenüber Sub-

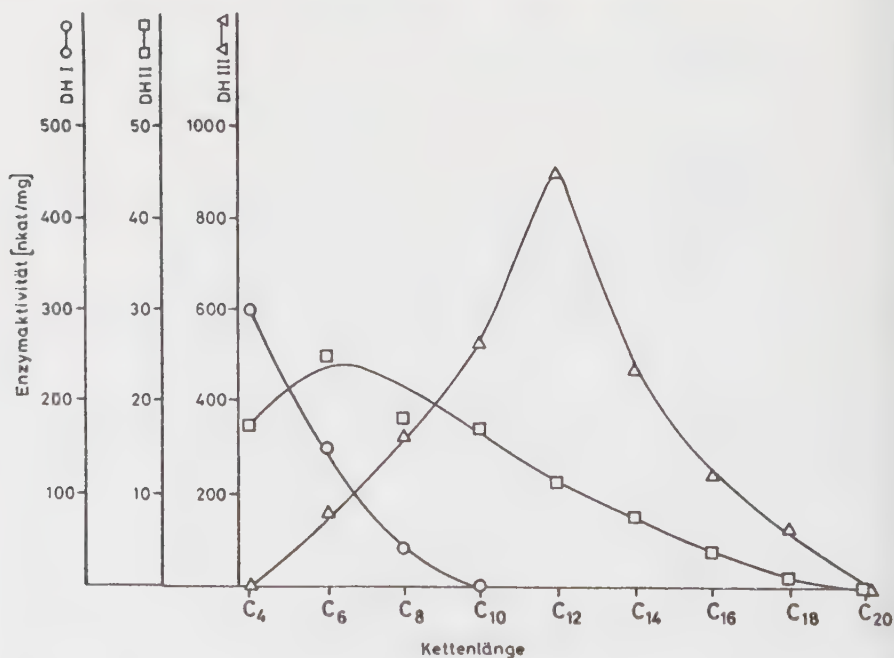


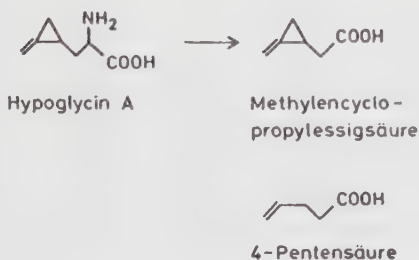
Abbildung 40: Kettenlängenspezifitäten der Acyl-CoA-Dehydrogenasen der Rinderleber gegenüber gesättigten Säuren. Es wurden die durch kinetische Messungen mit gereinigten Enzymen ermittelten Maximalgeschwindigkeiten aufgetragen.

(○—○) = DH I; (□—□) = DH II; (△—△) = DH III

straten mittlerer Kettenlänge. Bei längeren Acylresten sinkt $V_{\max}$, 18:0-CoA wird nur sehr langsam umgesetzt. Gesättigte Fettsäuren mit Kettenlängen über 18 Kohlenstoffatome werden von den Acyl-CoA-Dehydrogenasen der Rinderleber nicht oxidiert.

3.5.2. Kurzkettige ungesättigte Acyl-CoA-Ester

Mit dem Einfluß zweier kurzkettiger ungesättigter Säuren auf die β -Oxidation beschäftigen sich schon seit Ende der sechziger Jahre mehrere Arbeitsgruppen (76, 110 - 122), weil diese Säuren toxisch sind und schwere Hypoglykämie hervorrufen. Die eine Substanz, Methylencyclopropylessigsäure (MCPA), wurde als der aktive Metabolit des Pflanzengiftes Hypoglycin A identifiziert. Die andere, 4-Pentensäure (4-5:1-S), ist in ihrer Struktur sehr ähnlich. Es wurde daher vermutet, daß beide Substanzen über denselben physiologischen Block den hypoglykämischen Effekt bewirken (91).



In der vorliegenden Arbeit wurden die Reaktionen der gereinigten Acyl-CoA-Dehydrogenasen mit diesen Substanzen untersucht und ihr Einfluß auf die Oxidation anderer Fettsäuren getestet. MCPA wurde aus Hypoglycin A hergestellt, das freundlicherweise Herr Prof. von Holt, Kapstadt, zur Verfügung stellte. Es wurde durch oxidative Decarboxylierung in Methylencyclopropylacetaldehyd überführt und dann zur Säure oxidiert (76).

MCPA und 4-5:1-S ließen sich in guter Ausbeute in die CoA-ester überführen. Folgende Ergebnisse wurden gefunden:

4-5:1-CoA

4-5:1-CoA wird durch DH I und DH II oxidiert. Die K_M -Werte sind: $2,5 \times 10^{-6}$ mol/l für DH I und 1×10^{-5} mol/l für DH II. Die Maximalgeschwindigkeiten sind ungefähr gleich groß wie für 4:0-CoA. DH III setzt 4-5:1-CoA nicht um.

Durch photometrische Messungen bei 296 nm konnte bestätigt werden, daß 4-5:1-CoA und 4:0-CoA um dieselben Bindungsstellen konkurrieren: Die bei dieser Wellenlänge selektiv meßbaren Umsätze von 4-5:1-CoA zu 2t,4-5:2-CoA durch DH I und durch DH II werden nach Zusatz von 4:0-CoA verlangsamt (vgl. hierzu Kap. 3.6.1. und 4.1.1.).

MCPA

MCPA wird durch keine der drei Acyl-CoA-Dehydrogenasen oxidiert. MCPA hemmt die DH III nicht, für DH I und DH II wurde eine Hemmung beobachtet:

Bei Vorinkubation mit 5×10^{-5} bis 1×10^{-3} mol MCPA/l ist die Aktivität der DH I gegenüber 4:0-CoA um 90 % geringer als ohne MCPA. Die Hemmung klingt jedoch mit der Zeit ab, und zwar umso langsamer, je größer die MCPA-Konzentration ist. Beide Effekte sind unabhängig von der eingesetzten 4:0-CoA-Menge. Zur Hemmung der DH II sind größere MCPA-Konzentrationen notwendig: 10^{-4} mol MCPA/l bewirkt keine Hemmung, nach Vorinkubation mit 5×10^{-4} mol MCPA/l beträgt die Aktivität der DH II gegenüber 10:0-CoA nur ein Drittel der ohne MCPA gemessenen. Ein Abklingen der Hemmung ist in den ersten zehn Minuten nicht zu beobachten. Auch diese Effekte sind unabhängig von der eingesetzten 10:0-CoA-Menge.

3.5.3. Ungesättigte Acyl-CoA-Ester der Kettenlänge C_{10}

Der DH I kommt aufgrund ihrer Spezifität für kurzkettige Substrate keine Bedeutung zu für die eingangs geschilderten Fragen zum Abbau hochungesättigter Fettsäuren. Das für die Arbeitshypothese interessante Substrat 4c-10:1-CoA wurde erwartungsgemäß nicht umgesetzt.

Den Acyl-CoA-Dehydrogenasen DH II und DH III wurden verschiedene ungesättigte Acyl-CoA-Ester der Kettenlänge C_{10} als Substrate angeboten: 4c-10:1-CoA, 4c,7c-10:2-CoA, 4-Decinoyl-CoA, 5c-10:1-CoA, 6c-10:1-CoA und als Vergleich 10:0-CoA (Abb. 41, Tab. 10).

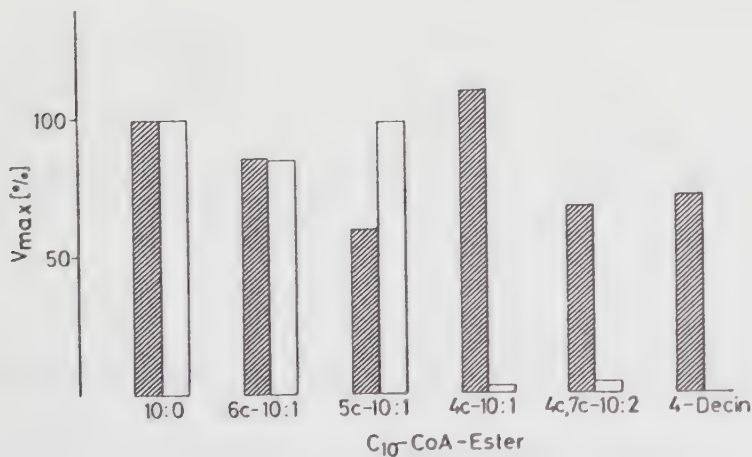


Abbildung 41: Umsatz verschiedener ungesättigter Acyl-CoA-Ester der Kettenlänge C_{10} durch DH II (▨) und DH III (□). Die zum Vergleich ebenfalls eingezeichneten Maximalgeschwindigkeiten, die mit dem gesättigten 10:0-CoA erhalten wurden, wurden gleich 100 % gesetzt (erstes Säulenpaar).

Tabelle 10: K_M - und V_{max} -Werte der Acyl-CoA-Dehydrogenasen aus Rinderleber für ungesättigte Acyl-CoA-Ester der Kettenlänge C_{10}

Ungesättigter Acyl-CoA- Ester	Dehydrogenase II			Dehydrogenase III		
	K_M mol/l	V_{max}^* nkat/mg	%	K_M mol/l	V_{max}^* nkat/mg	%
6c-10:1	$2,1 \cdot 10^{-6}$	15,0	86	$3,2 \cdot 10^{-4}$	444	85
5c-10:1	$3 \cdot 10^{-6}$	10,5	60	$2,0 \cdot 10^{-4}$	520	99
4c-10:1	$4 \cdot 10^{-6}$	19,1	110	$2,5 \cdot 10^{-4}$	14	2,7
4c,7c-10:2	$2,3 \cdot 10^{-6}$	11,8	68	$3,2 \cdot 10^{-4}$	20	3,8
4-Decinoyl	$6,5 \cdot 10^{-6}$	12,6	73	-	-	-
10:0	$2,9 \cdot 10^{-6}$	17,4	100	$1,3 \cdot 10^{-4}$	525	100

* Die V_{max} -Werte geben die spezifischen Aktivitäten der gereinigten Acyl-CoA-Dehydrogenasen an. Die Prozentangaben sind auf den Vergleichswert für das gesättigte Substrat 10:0-CoA bezogen (letzte Zeile).

Ein Vergleich der Daten zeigt:

- Die K_M -Werte stimmen mit denjenigen für die gesättigte Säure überein.
- Die DH III unterscheidet nicht zwischen 6c-10:1-CoA, 5c-10:1-CoA und 10:0-CoA, es sind gleich gute Substrate. Dagegen werden die CoA-Ester, die eine Mehrfachbindung zwischen dem vierten und fünften C-Atom aufweisen, nur mit minimalen Geschwindigkeiten umgesetzt ($V_{max} \hat{=} 0, 2,7$ und $3,8$ % von V_{max} der gesättigten Säure).
- Die DH II setzt alle Säuren um. Besonders ist der 4c-10:1-CoA hervorzuheben, der mit etwas höherer Geschwindigkeit oxidiert wird als 10:0-CoA.

3.5.4. Hochungesättigte essentielle Acyl-CoA-Ester

Nachdem die Reaktionen der Acyl-CoA-Dehydrogenasen mit dem Substrat 4c-10:1-CoA bekannt waren, wurde geprüft, ob sich diese Ergebnisse auf den partiellen Abbau hochungesättigter Fettsäuren übertragen ließen.

Es wurden also die CoA-Ester folgender hochungesättigter Fettsäuren synthetisiert und mit DH II und DH III getestet: 4,7,10,13-22:4-CoA und 5,8,11,14-20:4-CoA. Beide Substanzen wurden, genau wie die gesättigten Säuren, von der DH III nicht umgesetzt.

Mit DH II wurden keine eindeutig negativen Ergebnisse erhalten. Die Formazanbildung verlief jedoch so langsam und nicht linear mit der Zeit, daß aus diesen Messungen keine Aussagen getroffen werden konnten. Durch Zusatz von Rinderserumalbumin, das einer Micellenbildung der langkettigen Substrate entgegenwirken soll (55), wurde kein Effekt erzielt.

3.5.5. Reaktionen von DH II und DH III mit einer neuen Modells substanz

Es wurde daher versucht, die Befunde zur Sonderstellung der 4c-ungesättigten Fettsäuren anhand von Säuren solcher Kettenlängen zu untersuchen, von denen gewiß war, daß zumindest die gesättigten Verbindungen Substrate der Acyl-CoA-Dehydrogenasen darstellen.

Es wurde die 4,7,10,13-16:4-S ausgewählt. Als Vorstufe stand die entsprechende Säure mit vier Dreifachbindungen, die 4,7,10,13-Hexadecadiinsäure, zur Verfügung. Durch stereospezifische Hydrierung mit Lindlar-Katalysator (74) wurde die 4,7,10,13-16:4-S erhalten. Diese wurde in den CoA-Ester überführt und im Vergleich mit dem gesättigten Substrat, 16:0-CoA, der DH II und der DH III angeboten.

Mit DH II ergaben sich annähernd gleich K_M - und V_{max} -Werte. Auch die DH III setzt beide Substrate um, jedoch betrug die Maximalgeschwindigkeit für die ungesättigte Verbindung nur 22,2 % verglichen mit dem gesättigten 16:0-CoA-Ester (Abb. 42).

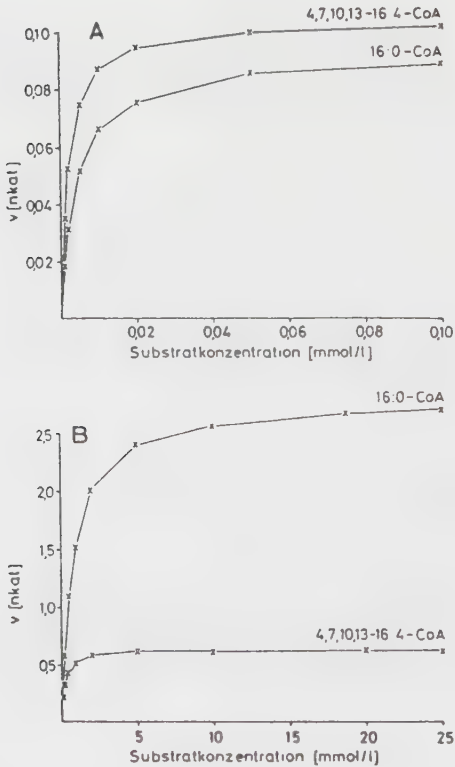


Abbildung 42: Michaelis-Menten-Diagramme für den Umsatz von 16:0-CoA und 4,7,10,13-16:4-CoA durch die Acyl-CoA-Dehydrogenasen DH II und DH III.

A Diagramme für DH II

B Diagramme für DH III

3.6. Bestimmung der Reaktionsprodukte

3.6.1. Produktanalyse durch photometrische Messung bei 296 nm

Durch die Einführung der 2t-Doppelbindung in einen Acyl-CoA-Ester mit einer schon vorhandenen Doppelbindung zwischen dem vierten und fünften C-Atom wird ein konjugiertes System erzeugt, an dem auch die Thioesterbindung beteiligt ist. Es hat

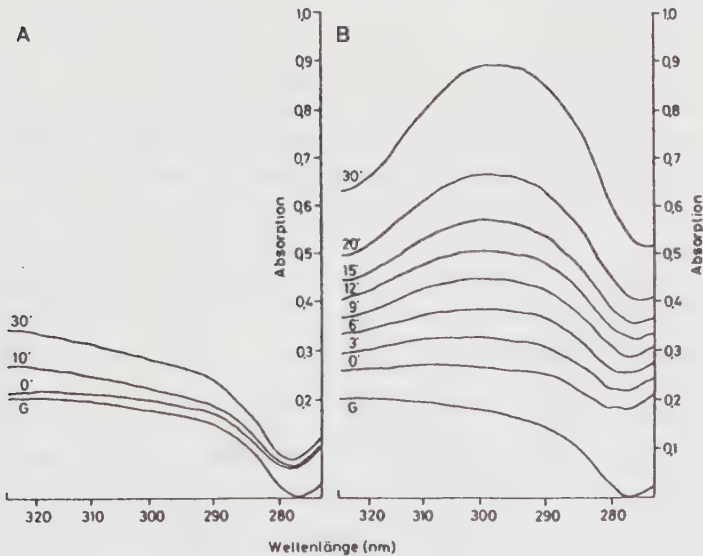


Abbildung 43: Ausbildung eines Absorptionsmaximums bei 296 nm (B) als Folge der Oxidation von 4c-10:1-CoA durch DH II. Zum Vergleich sind in A analoge Messungen mit 10:0-CoA aufgezeichnet. Beide Reaktionen wurden gegen Luft gemessen, so daß eine Grundabsorption (G, jeweils die unterste Linie) angezeigt wurde. Bei $t = 0$ wurden die Reaktionen gestartet (zweite Linie). Dann wurden zu den angegebenen Zeiten Spektren aufgenommen.

eine UV-Absorption bei 296 nm. Für dieses Absorptionsmaximum wurde von Wakil und Hübscher mit 2t,4t-6:2-CoA (Sorbinyl-CoA) ein Extinktionskoeffizient $\epsilon = 19\,500 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ bestimmt (92). Dadurch besteht die Möglichkeit, alle mit 4c-ungesättigten CoA-Estern meßbaren Acyl-CoA-Dehydrogenasereaktionen nicht nur indirekt über die Formazanbildung sondern auch direkt über die Absorptionzunahme bei 296 nm zu verfolgen und das Produkt anhand dieser Absorptionzunahme als 2,4-Dienoyl-CoA zu identifizieren (Abb. 43).

3.6.2. Produktanalyse mit radioaktiv markierten Substraten

Zur Überprüfung der Reaktionsprodukte wurden Inkubationen mit radioaktiv markierten Substraten durchgeführt. Nach definierten Zeiten wurde durch Denaturieren mit NaOH gestoppt, die Fettsäuren extrahiert und nach Überführung in die Methylester radiogaschromatographisch analysiert. Die Analysenbedingungen wurden von P. Dommes entwickelt, der auch die Referenzsubstanzen synthetisierte (29, 84).

Abbildung 44: Radiogaschromatographische Produktanalyse: Umsatz von 10:0-CoA im Rohextrakt.

Inkubationsansatz A: Rohextrakt (0,45 mg Protein) wurde mit $10^{-4} \text{ mol } [1-^{14}\text{C}]\text{-10:0-CoA/l}$ 30 min inkubiert.

Inkubationsansatz B: wie unter A, jedoch mit Elektronenakzeptoren (10^{-4} mol MB/l ; $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol INT/l}$).

Zur radiogas chromatographischen Analyse wurden die Fettsäure-CoA-Ester in die Methylester (ME) überführt. Die Massenpeaks zeigen zugesetzte inaktive Referenzsubstanzen. Die durch die Säulen dargestellten Radioaktivitätsmengen sind korrigiert durch Subtraktion eines Untergrundes von 50 cpm.

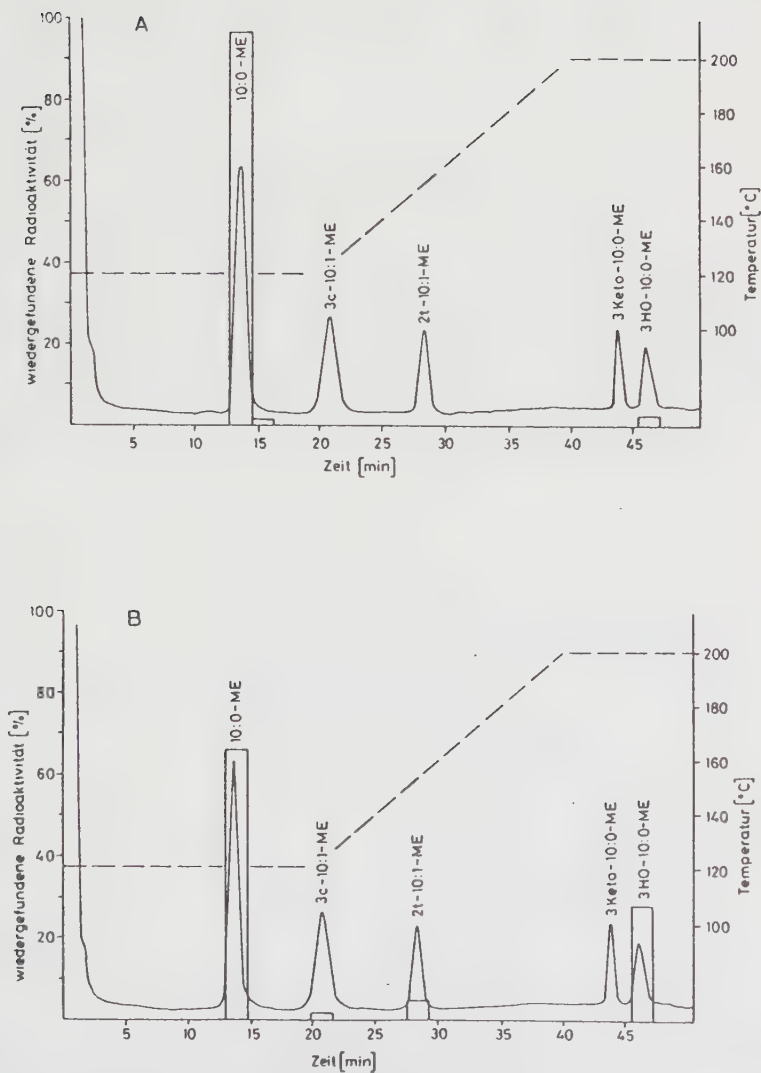


Abbildung 44

Die Methode wurde an Rohextrakt mit $[1-^{14}\text{C}]\text{-10:0-CoA}$ ausgetestet: Inkubation des Rohextraktes mit 10:0-CoA bringt keinen Substratumsatz; alle wiedergefundene Radioaktivität ist im Ausgangsprodukt (Abb. 44 A).

Setzt man zu Rohextrakt und 10:0-CoA die Elektronenakzeptoren MB und INT zu (vgl. photometrischer Test, Kap. 3.1.), so werden vier radioaktiv markierte Verbindungen erhalten (Abb. 44 B), die durch Vergleich mit Eichsubstanzen identifiziert wurden als 10:0-ME, 3-10:1-ME, 2t-10:1-ME und 3-OH-10:0-ME. Entsprechend der bekannten β -Oxidationssequenz sind drei dieser Produkte (Abb. 45) Ausgangssubstanz (1), direktes Oxidationsprodukt (2) und der nächstfolgende Metabolit (3). 3-10:1-CoA (6) entsteht durch eine Seitenreaktion mit Hilfe der 3cis,2trans-Enoyl-CoA-Isomerase aus (2). Die Produkte (4) und (5) werden nicht gefunden.

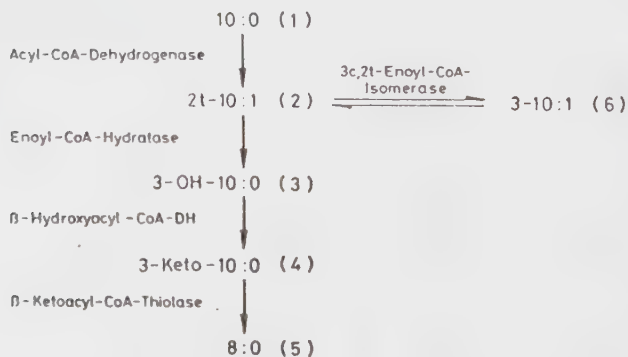


Abbildung 45: Sequenz der Metaboliten beim Abbau von 10:0-CoA. Die in Klammern angegebenen Zahlen bezeichnen die im Text genannten Verbindungen.

Nach demselben Verfahren wurden folgende Reaktionen untersucht (Abb.46): Gereinigte Acyl-CoA-Dehydrogenasen (DH II und DH III) wurden in Gegenwart der Elektronenakzeptoren MB und INT mit den Substraten [$1-^{14}\text{C}$]-10:0-CoA bzw [$4,5-^3\text{H}$]-4c-10:1-CoA umgesetzt.

Aus [$1-^{14}\text{C}$]-10:0-CoA entsteht durch beide Dehydrogenasen radioaktiv markiertes 2t-10:1-CoA (Abb. 46 A, B).

Aus den Inkubationen von [$4,5-^3\text{H}$]-4c-10:1-CoA mit DH II werden zwei radioaktiv markierte Oxidationsprodukte isoliert, 2t,4c-10:2-ME und 2t,4t-10:2-ME (Abb. 46 C). Das 2t,4t-Produkt entsteht durch Isomerisierung des 2t,4c-Produktes während der Umesterung, ist also ein Aufarbeitungsartefakt (84).

Abbildung 46: Radiogaschromatographische Produktanalysen mit gereinigten Acyl-CoA-Dehydrogenasen.

In allen Inkubationsansätzen wurden je 250 nmol Acyl-CoA mit 1,67 nkat Dehydrogenaseaktivität (bezogen auf den Umsatz von 10:0-CoA) in Gegenwart von 10^{-4} mol MB/l und $2,5 \times 10^{-4}$ mol INT/l bei 30°C 10 min lang umgesetzt.

A: DH II und [$1-^{14}\text{C}$]-10:0-CoA

B: DH III und [$1-^{14}\text{C}$]-10:0-CoA

C: DH II und [$4,5-^3\text{H}$]-4c-10:1-CoA

D: DH III und [$4,5-^3\text{H}$]-4c-10:1-CoA

Zur radiogaschromatographischen Analyse wurden die Fettsäure-CoA-Ester in die Methylester (ME) überführt. Die Massenpeaks zeigen zugesetzte inaktive Referenzsubstanzen. Die durch die Säulen dargestellten Radioaktivitätsmengen sind korrigiert durch Subtraktion eines Untergrundes von 50 cpm.

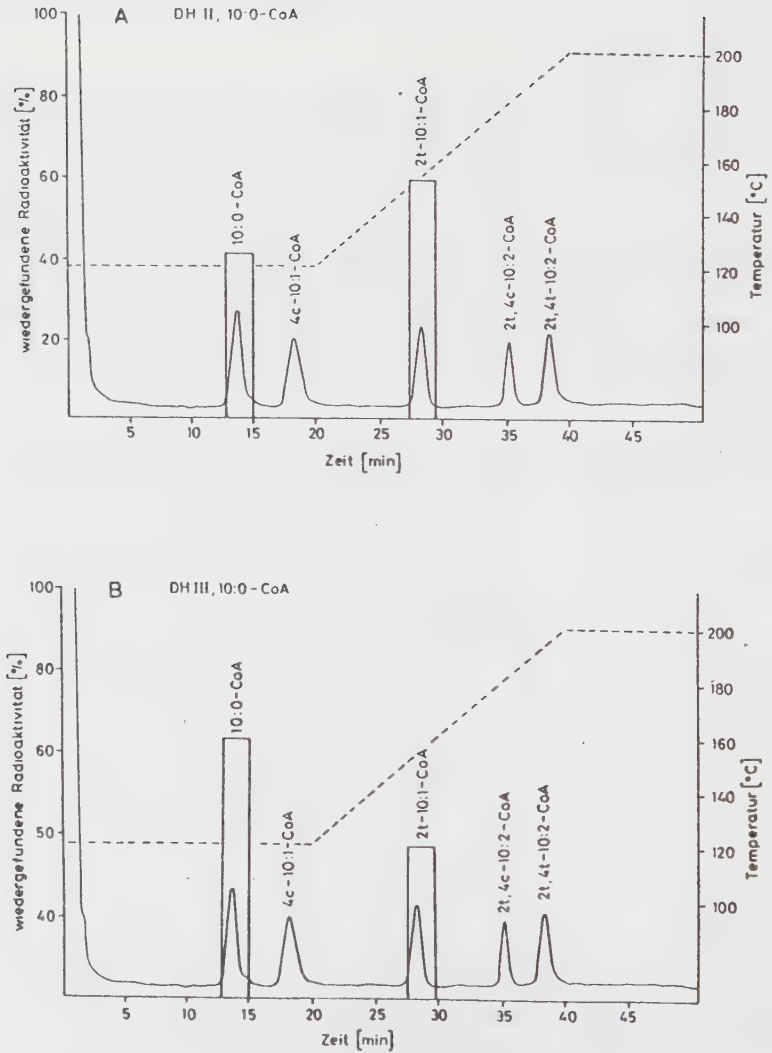


Abbildung 46 A und B

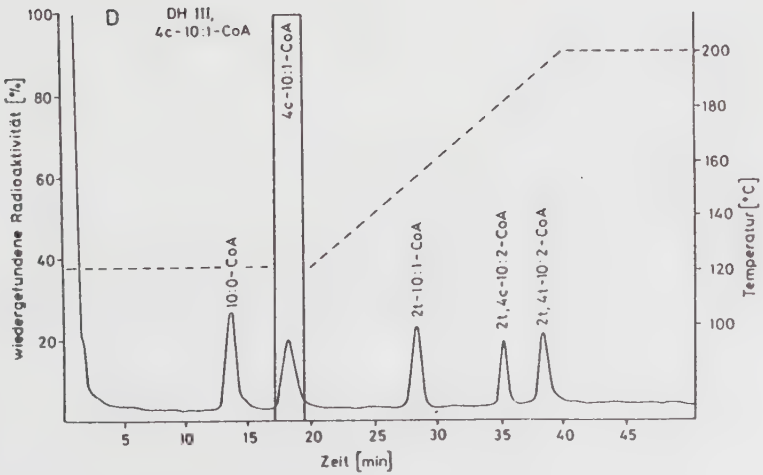
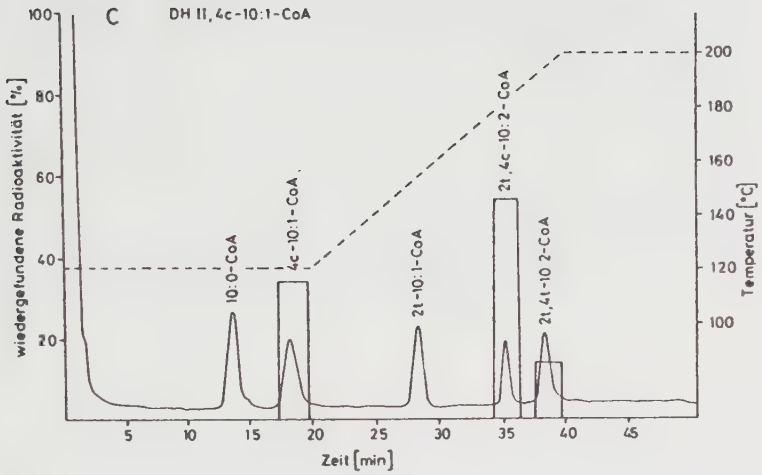


Abbildung 46 C und D

Beim Umsatz von $[4,5-^3\text{H}]\text{-4c-10:1-CoA}$ durch DH III werden diese Reaktionsprodukte unter den normalen Inkubationsbedingungen nicht gefunden (Abb. 46 D). Ein Inkubationsansatz, der erst nach zehn Stunden gestoppt wurde, zeigte 1,3 % der wiedergefundenen Radioaktivität in 2t,4t-10:2-ME und 2,0 % in 2t,4c-10:2-ME.

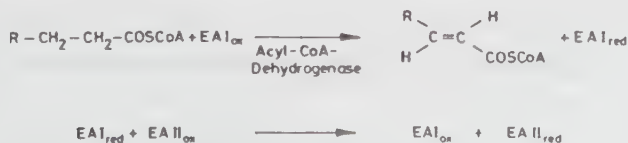
4. Diskussion

Nach dem Nachweis der 4-Enoyl-CoA-Reduktase durch Kunau und Bartnik (27, 28) war, wie einleitend beschrieben, die Frage aufgeworfen worden: Ist 4c-10:1-CoA ein Substrat der Acyl-CoA-Dehydrogenase? Um diese Frage zu klären, waren neben dem Substrat das Enzym bzw. die Enzyme und ein Meßverfahren notwendig. Die Enzyme mußten gereinigt und voneinander getrennt werden. Dafür waren neben dem Enzymtest zwei weitere Punkte zu klären: Die Anzahl der in der Rinderleber vorhandenen Acyl-CoA-Dehydrogenasen und die Möglichkeit, diese verschiedenen Enzyme voneinander zu unterscheiden.

4.1. Analytik

4.1.1. Kontinuierliche photometrische Bestimmung von Acyl-CoA-Dehydrogenasen

In der Einleitung wurde bereits erwähnt, daß die Bestimmung der Acyl-CoA-Dehydrogenase-Aktivitäten problematisch und bislang nicht befriedigend gelöst war. Alle benutzten Methoden beruhen auf dem in vivo-System, der Kopplung der Dehydrogenase-Reaktion an hintereinandergeschaltete Elektronenakzeptoren (EA). Dabei wird entweder nur das natürliche terminale Akzeptorsystem EA II oder auch der primäre Elektronenakzeptor EA I durch unphysiologische Substanzen ersetzt. Die Reduktion von EA II wird gemessen. Sie ist proportional der Bildung von 2t-ungesättigtem Fettsäure-CoA-Ester.



Die in der Literatur beschriebenen Elektronenakzeptoren sind in Tabelle 11 zusammengefaßt.

Tabelle 11: Künstliche Elektronenakzeptoren in der Literatur

	EA I	EA II
in vivo	ETF	ETF-Ubichinon-Oxido-reduktase → Atmungskette
in vitro		
Green et al. (8)	Methylenblau	Triphenyltetrazolium oder Neotetrazolium
"	ETF	DCI* oder Cytochrom c oder $K_3Fe(CN)_6$
Crane et al. (9)	ETF	DCI
Hauge (38)	ETF	DCI
"	PMS**	Cytochrom c
Beinert (43)	PMS	DCI
Gelbard u. Goldman (48)	Methylenblau	Tetrazoliumsalz
Hoskins (49)	PMS	DCI
Engel u. Massey (50)	PMS	DCI
Holland et al. (53)	PMS	Cytochrom c
Hall et al. (54)	ETF	DCI
Ward u. Fairbairn (85)	PMS	Triphenyltetrazolium

* DCI = 2,6-Dichlorphenolindophenol

** PMS = Phenazinmethosulfat

Folgende Nachteile der verwendeten Substanzen waren beschrieben:

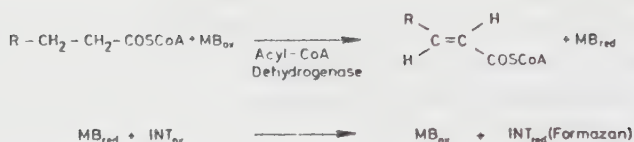
- ETF muß Acyl-CoA-Dehydrogenase-frei zur Verfügung stehen (43).
- Methylenblau muß unter anaeroben Bedingungen gehandhabt werden (93).
- PMS ist licht- und sauerstoffempfindlich (94). Lösungen von PMS sind daher nur sehr kurze Zeit haltbar.

- Tetrazoliumsalze finden als Indikatoren für Dehydrogenasen in der Histochemie breite Anwendung, weil ihre reduzierten Formen schwer wasserlöslich sind (95,96). Zur quantitativen Bestimmung müssen sie mit organischen Lösungsmitteln extrahiert werden und erlauben daher keine kontinuierliche Messung (8).

Da zu Beginn dieser Arbeit nur ein Rohextrakt aus Acetontrockenpulver von Rinderlebermitochondrien verfügbar war, waren weder ETF-freie Acyl-CoA-Dehydrogenase-Fraktionen noch Acyl-CoA-Dehydrogenase-freies ETF vorhanden. Ein ETF-unabhängiges Testsystem mit künstlichen Elektronenakzeptoren war notwendig.

Die Versuche mit FMS als primären Elektronenakzeptor (Kap.3.1., S. 33) zeigten, daß FMS ungeeignet ist. Diese Versuche waren durchgeführt worden, obwohl die Licht- und Sauerstoffempfindlichkeit dieses Elektronenakzeptors bekannt war, denn FMS wird trotzdem in den meisten in der Literatur beschriebenen Meßverfahren verwendet. Der am häufigsten benutzte sekundäre Elektronenakzeptor 2,6-Dichlorphenolindophenol (DCI) zeigte bei höheren Konzentrationen eine unabhängig von der Art des primären Elektronenakzeptors auftretende Hemmung (Abb. 9, S. 40). DCI konnte also nicht im Überschuß angeboten werden und war daher als terminaler Akzeptor nicht geeignet.

Möllering et al. (94) beschrieben ein Elektronenakzeptorsystem bestehend aus Meldolablauf (EA I) und Jodnitrotetrazoliumchlorid (EA II) für die kontinuierliche Messung von NAD-abhängigen Reaktionen. Hierbei wird das gebildete schwerlösliche Formazan durch Detergentienzusatz in Lösung gehalten. Die Ergebnisse der in Kap. 3.1. wiedergegebenen Versuche zeigen, daß dieses System auch für die FAD-abhängigen Acyl-CoA-Dehydrogenasen verwendbar ist:



Die Optimierungsversuche ergaben ein pH-Optimum von 9,0 (Abb. 12, S. 42). Dennoch wurde ein pH-Wert von 8,0 gewählt, weil die Acyl-CoA-Ester in alkalischem Milieu ($> \text{pH } 8,5$) zu hydrolysieren beginnen (97) und weil eine Zersetzung des CoA-Esters bei langsam ablaufenden Enzymreaktionen die Messungen beeinflussen muß. Auch der Elektronenakzeptor Meldolablau ist bei hohen pH-Werten nicht über längere Zeit beständig.

Eine wichtige positive Eigenschaft des neuen kontinuierlichen Acyl-CoA-Dehydrogenasetests ist seine Unabhängigkeit von ETF. Dies ergibt sich aus der Aktivitätsmessung mit partiell gereinigten und sauberen Enzymfraktionen. Da außerdem die lineare Abhängigkeit zwischen Enzymmenge und Anfangsgeschwindigkeit für mehrere Substrate nachgewiesen wurde (Abb. 16, S. 45), stand mit diesem Enzymtest mit Meldolablau als primärem und Jodnitrotetrazoliumchlorid als sekundärem Elektronenakzeptor ein schnelles, kontinuierliches photometrisches Testverfahren zur Verfügung, das für alle Reinigungsstufen verlässlich verwendbar ist.

Neben diesem photometrischen Test, der auf der Reduktion eines künstlichen Elektronenakzeptors beruht, besteht bei einigen Substraten die Möglichkeit, unter Ausnutzung einer Beobachtung von Wakil und Hübscher (92) die Entstehung des Produktes der enzymatischen Oxidation direkt zu verfolgen: Diese Autoren beschrieben für Sorbinyl-CoA (2t,4t-6:2-CoA) ein Absorptionsmaximum bei 296 nm, das durch die konjugierten Doppelbindungen unter Beteiligung der Thioestergruppierung

bedingt ist. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt (Kap. 3.6.1., S.101), daß bei der Oxidation von 4c-10:1-CoA durch die Acyl-CoA-Dehydrogenasereaktion ebenfalls eine Absorptionszunahme bei 296 nm beobachtet werden kann, da durch die Einführung der 2t-Doppelbindung ein entsprechendes konjugiertes System ausgebildet wird (Abb. 43, S.101). So konnte für alle Substrate mit einer Doppelbindung zwischen dem 4. und 5. C-Atom die Bildung des Reaktionsproduktes direkt gemessen werden.

Die Gegenwart der Elektronenakzeptoren ist auch in diesem Testsystem notwendig, obwohl ihre Reduktion hier nicht bestimmt wird. Sie dienen zur Regeneration des FAD der Acyl-CoA-Dehydrogenasen. Aus demselben Grund wurden sie auch in die Inkubation für die radiogaschromatographische Produktanalyse eingesetzt (Kap. 3.6.2., S.102). Die Messung der Enzymaktivität bei 296 nm gibt keinen Aufschluß darüber, welche der drei Acyl-CoA-Dehydrogenasen die Einführung der 2t-Doppelbindung bewirkte und bietet daher keinen Vorteil gegenüber der Messung bei 492 nm. Für die Entscheidung, ob in Position 4 ungesättigte Acyl-CoA-Ester Substrate für Acyl-CoA-Dehydrogenasen sind, war die direkte Messung der Reaktionsprodukte jedoch beweiskräftiger als die gekoppelte Reduktion eines künstlichen Elektronenakzeptors. Außerdem war, da einige dieser Reaktionen nur sehr langsam abliefen, die doppelte Aktivitätskontrolle (bei 296 und 492 nm) vorteilhaft. So konnte die bei 492 nm registrierte Formazanbildung mit 4-5:1-CoA und 4,7,10,13-16:4-CoA durch Messungen bei 296 nm eindeutig als Folge der enzymatischen Einführung der 2t-Doppelbindung bestätigt werden.

Eine Unterscheidung der verschiedenen Acyl-CoA-Dehydrogenasen war allerdings, wie schon erwähnt, durch beide photometrischen Testverfahren nicht erreichbar.

4.1.2. Differenzierung der Acyl-CoA-Dehydrogenasen

Die Unterscheidung der Acyl-CoA-Dehydrogenasen voneinander war in allen in der Literatur beschriebenen Fällen durch die Umsetzung von Substraten unterschiedlicher Kettenlängen getroffen worden. Dieses Verfahren ist jedoch nicht ausreichend, da die Spezifität der Enzyme für verschiedene Kettenlängen zu gering ist: z.B. war für die gereinigten Enzyme der Schweineleber nicht ein einziges Substrat bekannt, das nur von einer Acyl-CoA-Dehydrogenase umgesetzt wird (37) (vgl. Abb. 20, S. 52).

Solange über die Reinigung nur einer Acyl-CoA-Dehydrogenase berichtet wurde, benutzten die Autoren nur ein Substrat und verzichteten darauf, Anteile anderer Acyl-CoA-Dehydrogenasen an den gemessenen Enzymaktivitäten zu untersuchen. Wenn mehrere Acyl-CoA-Dehydrogenasen nebeneinander gemessen werden sollten, machte sich dieser gravierende methodische Mangel jedoch noch deutlicher bemerkbar. So konnten, obwohl mehrere Arbeitsgruppen über Acyl-CoA-Dehydrogenasen der Rinderleber gearbeitet haben, keine eindeutigen Angaben über die hier vorhandene Anzahl dieser Enzyme und deren Kettenlängenspezifitäten gemacht werden; es wurden zwei Enzyme beschrieben (8, 53), ein drittes wurde vermutet, konnte aber nicht nachgewiesen werden (43).

Das Fehlen spezifischer Substrate für die einzelnen Acyl-CoA-Dehydrogenasen erforderte neben dem photometrischen Test ein Verfahren, das die Unterscheidung auf andere Weise ermöglichte. Die Entwicklung eines solchen Verfahrens gelang in der vorliegenden Arbeit durch die Übernahme einer aus der Histochemie für Dehydrogenasen bekannten Färbetechnik (95, 96) und deren ebenso bekannte Anwendung zur Lokalisierung von Lactat-Dehydrogenase im Polyacrylamidgel nach Elektrophorese (98). Durch Austesten verschiedener Elektrophoresesysteme konnte ein System gefunden werden (M 6) (63 , 64), das zur

elektrophoretischen Trennung und zur anschließenden spezifischen Anfärbung der Acyl-CoA-Dehydrogenasen geeignet ist.

Die Anfärbung basiert - wie auch der photometrische Enzymtest - auf der enzymatischen Oxidation des CoA-Esters und der daran gekoppelten Reduktion eines Tetrazoliumsalzes. Abhängig vom angebotenen Substrat bewirken jeweils diejenigen Acyl-CoA-Dehydrogenasen die Färbung, die dieses Substrat umsetzen können. Da eine Elektrophorese vorausgeht, sind nun die Acyl-CoA-Dehydrogenasen, die das angebotene Substrat umsetzen können, räumlich voneinander getrennt und bilden unterschiedlich lokalisierte Formazanbanden aus.

So konnte gezeigt werden, daß drei Acyl-CoA-Dehydrogenasen existieren. Zwei der drei Enzyme werden jedoch nur wenig aufgetrennt, so daß oft eine überlagernde Doppelbande ausgebildet wird. Das geschieht um so leichter, je unterschiedlicher die Enzymaktivitäten der beiden Dehydrogenasen (DH I und DH II) sind (Abb. 19, S. 51). Mit den gereinigten Enzymen konnte die Existenz getrennter Banden für DH I und DH II bewiesen werden: durch Rekombination unter Verwendung gleich hoher Enzymaktivitäten wurde der eindeutige Beweis erbracht (Abb. 30, S. 79).

Für Routinekontrollen wurden zur Anfärbung die Substrate 4:O-CoA und 10:O-CoA verwendet, da alle Acyl-CoA-Dehydrogenasen der Rinderleber - ebenso wie die Enzyme der Schweineleber - eines oder beide Substrate umsetzen. 16:O-CoA wurde nicht benutzt, denn es ließen sich mit diesem Substrat keine zusätzlichen analytisch wichtigen Daten erhalten, da es von denselben Acyl-CoA-Dehydrogenasen umgesetzt wird, wie 10:O-CoA (DH II und DH III). Außerdem ist die Anfärbung mit 16:O-CoA unempfindlicher, weil die Färbereaktion mit diesem Substrat langsamer abläuft als mit 10:O-CoA (Abb. 21, S. 53). Das ist durch die niedrigen $V_{\max}$ -Werte zu erklären. (Tab. 9, S. 92)

Die in dieser Arbeit entwickelten analytischen Methoden, die eine Differenzierung der unterschiedlichen Acyl-CoA-Dehydrogenasen erlauben, machten eine Überprüfung der Reinigungsschritte hinsichtlich der Trennung der einzelnen Acyl-CoA-Dehydrogenasen möglich. Mit ihrer Hilfe gelang es außerdem erstmalig, ein spezifisches Substrat für eine der drei Dehydrogenasen aufzufinden: 4c-10:1-CoA wird nur von der DH II in nennenswertem Maße umgesetzt. Für die DH I ist 4c-10:1-CoA kein Substrat, die DH III setzt es so langsam um, daß nach 10 min Reaktionszeit durch radiogaschromatographische Analyse kein Produkt (2t, 4c-10:2-CoA) nachweisbar ist. Das ist von besonderer Bedeutung, weil damit gezeigt ist, daß durch Verwendung von 4c-10:1-CoA im photometrischen Test die selektive Bestimmung der DH II-Aktivität neben den anderen Acyl-CoA-Dehydrogenasen möglich ist.

4.2. Enzymreinigung

4.2.1. Kritik an bisherigen Reinigungsverfahren: mangelnde Analytik

Bislang wurde in der Literatur meist nur die Isolierung einer Acyl-CoA-Dehydrogenase beschrieben (8-10, 48-51, 54, 55), nur in zwei Fällen ist die parallele Reinigung mehrerer Acyl-CoA-Dehydrogenasen nebeneinander aus dem gleichen Organ versucht worden (43, 53). Eine Übersicht über die benutzten Reinigungsverfahren ist in Tabelle 12 zusammengefaßt.

Die Effektivität der Reinigungsschritte wurde nur durch einen unzureichenden Enzymtest kontrolliert. Neben diesem Nachteil wurde die Kontrolle zusätzlich durch folgenden Umstand erschwert:

Die Auswahl von 4:0-CoA, 8:0-CoA und 16:0-CoA als Testsubstraten bedeutete nicht nur eine ungleichmäßige Abdeckung

Tabelle 12: In der Literatur beschriebene Reinigungsverfahren für Acyl-CoA-Dehydrogenasen

Methode	Acyl-CoA-Dehydrogenase	Enzymquelle	Literatur
Ammoniumsulfat-fällung	DH I, DH II, DH III	Rinderleber, Schweineleber, M.tuberculosis*, Affenleber, M.elsdenii**, Rinderherz	8,9,10,43, 48,49,50, 53,54,55
Hitze-fällung	DH I, DH II, DH III	Schweineleber	9,10,43
Äthanol-fällung	DH I, DH II, DH III	Rinderleber, Schweineleber, Affenleber	8,9,43,49
Säure-fällung	DH I	M.elsdenii	50
Adsorption an Zn(OH) ₂ -Gel	DH I, DH II, DH III	Rinderleber, Schweineleber, Affenleber	8,9,10,43, 49
Adsorption an Alumina C _y	DH I	Rinderleber	8
Adsorption an Calciumphosphatgel	DH I	M.tuberculosis	48
Adsorption an DEAE-Sephadex	DH I	Rinderherz	43
Chromatographie an Hydroxylapatit	DH I	M.tuberculosis	48
Chromatographie an DEAE-Cellulose	DH I, DH II	Schweineleber, Affenleber, M.elsdenii, Rinderleber, Rinderherz	43,49,50, 53,54,55
Chromatographie an Sephadex G-200	DH I, DH II	M.elsdenii, Rinderleber, Schweineleber	50,54,55
Elektrophorese in Stärkegel	DH I, DH II	Schweineleber	9,43
Elektrophorese in Sephadex G-200	DH I, DH II	M.elsdenii, Schweineleber, Rinderherz	50,53,54

* M.tuberculosis = Mycobacterium tuberculosis

** M.elsdenii = Megaspheera elsdennii

des Kettenlängenbereichs, sie war auch unzweckmäßig. 8:O-CoA ist zur Kontrolle der Trennung verschiedener Acyl-CoA-Dehydrogenasen völlig ungeeignet, da es eines der wenigen Substrate ist, die von allen drei Enzymen umgesetzt werden. Das war schon seit den Untersuchungen von Crane et al. (37) an den Acyl-CoA-Estern der Schweineleber bekannt. Neben 4:O-CoA, dem Substrat für DH I und DH II, wäre die Verwendung eines Substrates, das DH I nicht, dafür aber DH II und DH III umsetzt, aufschlußreicher gewesen. Diese Rolle konnte zwar 16:O-CoA übernehmen, jedoch ist der Test mit dieser Substanz aufgrund ihrer niedrigen Umsatzgeschwindigkeit durch DH II und DH III recht unempfindlich (vgl. Abb. 21, S. 53). Es ist daher nicht verständlich, warum nicht 10:O-CoA oder 12:O-CoA als mittelkettiges Substrat eingesetzt wurde.

Neben den Enzymtesten wurde als weitere Kontrolle der Reinigung in manchen Arbeiten die Aufzeichnung von UV-Spektren beschrieben (48, 50). Aus den Absorptionsmaxima wurde das Verhältnis Protein/Flavin ($A_{275}:A_{445}$) berechnet. Hierdurch konnte zwar die Abtrennung von Fremdprotein verfolgt werden, eine Unterscheidung der verschiedenen Acyl-CoA-Dehydrogenasen war jedoch so nicht möglich.

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand der erarbeiteten verbesserten Analytik die Leistungsfähigkeit der Reinigungsmethoden an Rohextrakten untersucht, um diese Informationen zur Zusammenstellung eines sinnvollen Reinigungsganges zu verwerten. Die Reinigung sollte aus zwei Teilen bestehen:

1. Abtrennung von Fremdprotein unter Erhalt einer gemeinsamen Acyl-CoA-Dehydrogenasefraktion,
2. Trennung der Acyl-CoA-Dehydrogenasen voneinander.

4.2.2. Optimierung der Reinigungsmethoden und Aufbau des Reinigungsschemas

Aus dem Vergleich der in der Literatur beschriebenen Verfahren und den in dieser Arbeit mit Hilfe der verbesserten Analytik erhaltenen Daten ergab sich folgendes Bild:

Die von allen Arbeitsgruppen verwendete Ammoniumsulfatfällung ist zur Auftrennung der Acyl-CoA-Dehydrogenasen ungeeignet (Abb. 23). Die willkürliche Aufteilung in Fraktionen mit stark überlappenden Enzymaktivitäten, von denen meist nur eine zur Reinigung einer bestimmten Acyl-CoA-Dehydrogenase benutzt wurde, führte zu sehr hohen Verlusten schon im ersten Reinigungsschritt. Außerdem mußte für jede Dehydrogenasefraktion ein eigenes Reinigungsverfahren angeschlossen werden.

Bei der Adsorption an Alumina C_Y wurden in der vorliegenden Arbeit zwar 98 % der Proteine aus dem Rohextrakt an das Gel gebunden. Die Proteinmengen und die Enzymaktivitäten, die mit zu 40 % ammoniumsulfatgesättigtem Puffer vom Gel eluiert wurden, entsprachen jedoch denjenigen, die bei 40 % Ammoniumsulfatsättigung eines entsprechenden Rohextraktes auch im Überstand gelöst blieben (vgl. Kap. 3.3.4.1., S. 62, Tabelle 4 und Kap. 3.3.4.2., S. 63, Tabelle 5). Ob in Gegenwart des Gels eine leichte Verschiebung der Proteinpräzipitation zu niedrigeren Ammoniumsulfatkonzentrationen erfolgt, wie sie von der Haar für Sepharose beschreibt (99), wurde nicht überprüft. Solche Effekte können jedoch nicht von großem Einfluß sein, da Proteinmengen und Enzymaktivitäten in den Überständen ungefähr gleich waren.

Der beobachtete Effekt ist also eher durch das Ammoniumsulfat als durch Alumina C_Y bedingt. Diese Beobachtung führte zur Durchführung einer verbesserten Ammoniumsulfatfällung: Die Verwendung einer Ammoniumsulfatlösung in Trispuffer, die zum Schutz der Acyl-CoA-Dehydrogenasen FAD, EDTA und DTE enthielt,

führte unter Erhalt der Enzymaktivität zu einer effektiven Abtrennung von Fremdprotein.

Gelfiltration wurde nur von wenigen Arbeitsgruppen durchgeführt, da die Acyl-CoA-Dehydrogenasen durch dieses Verfahren nicht trennbar sind. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch die Gelfiltration erfolgreich zur Abtrennung von Fremdprotein genutzt (Abb. 26, S. 67). Dabei wurde eine ebenso effiziente Anreicherung erzielt wie bei der verbesserten Ammoniumsulfatfällung. Da beide Methoden auf unterschiedlichen Eigenschaften der Enzyme beruhen, konnte durch Kombination beider Verfahren eine Steigerung der Effektivität erzielt werden. Mit diesen beiden Schritten, in denen die Acyl-CoA-Dehydrogenasen gemeinsam angereichert werden, wurde daher das Reinigungsverfahren eingeleitet. Die Reihenfolge, zuerst Ammoniumsulfatfällung, dann Gelchromatographie, wurde aus praktischen Gründen gewählt (vgl. Kap. 3.3.5., S. 68).

Von den Verfahren, deren Trennleistung auf der Ladung der Proteine beruht, war die präparative Elektrofocussierung ungeeignet (Kap. 3.3.4.6., S. 68) und die präparative Elektrophorese nur bedingt geeignet (Kap. 3.3.4.5., S. 67, Abb. 19, S. 51). Sehr gute Erfolge brachte hingegen die Ionenaustauschchromatographie. Obwohl mehrere Autoren die Auftrennung von Acyl-CoA-Dehydrogenasen beobachtet hatten, war dieser Schritt bislang nur zur Abtrennung von ETF oder Fremdprotein verwendet worden, nie zur parallelen Gewinnung der einzelnen Acyl-CoA-Dehydrogenasen. Unter allen Verfahren, die in der vorliegenden Arbeit im Rohextrakt überprüft wurden, ist die Chromatographie an DEAE-Anionenaustauschern das geeignetste Verfahren zur Auftrennung der Acyl-CoA-Dehydrogenasen. Zusätzlich wird eine effektive Anreicherung beobachtet.

Die Trennleistung der DEAE-Cellulosesäule konnte noch beträchtlich gesteigert werden durch die Vorreinigung der Acyl-CoA-Dehydrogenasen durch verbesserte Ammoniumsulfatfällung und Gelfiltration an Sephadex G-150 (vgl. Abb. 25,

S. 65 und Abb. 28, S. 73). Die abschließende Reinigung gelang durch präparative Elektrophorese.

Die Bestimmung von Aktivitäten anderer β -Oxidationsenzyme während der Reinigung von Acyl-CoA-Dehydrogenasen ist bislang in der Literatur nicht beschrieben. Während Enoyl-CoA-Hydratase, β -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase und β -Keto-Acyl-CoA-Thiolase bei der Ammoniumsulfatfällung und durch die Gelchromatographie an Sephadex G-150 mit den Acyl-CoA-Dehydrogenasen gemeinsam angereichert werden, erfolgt die Abtrennung der drei Enzyme durch die DEAE-Cellulosesäule. Auch die 4-Enoyl-CoA-Reduktase wird in diesem Reinigungsschritt entfernt (W.-H. Kunau und V. Dommès, unveröffentlichte Ergebnisse).

4.3. Charakterisierung der gereinigten Acyl-CoA-Dehydrogenasen

Die Molekulargewichte der nativen und der in Untereinheiten dissoziierten Acyl-CoA-Dehydrogenasen sind: DH I: 188 000 bzw. 40 000, DH II: 206 000 bzw. 43 000, DH III: 172 000 bzw. 45 000. Unter der Annahme, daß die Enzyme Tetramere sind (54), erhält man keine gute Übereinstimmung der Molekulargewichte der Untereinheiten und der nativen Enzyme. Auch in der Arbeit von Hall et al. (55) werden in den Molekulargewichtsbestimmungen der Acyl-CoA-Dehydrogenase II große Unterschiede zwischen den Daten für das native Protein und für die Untereinheit beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde bei Vergleich der verschiedenen Acyl-CoA-Dehydrogenasen eine zusätzliche Beobachtung gemacht: Da jedes dieser Enzyme aus identischen Untereinheiten aufgebaut ist (Kap. 3.4.1., S. 84), sollte die Größe der dissoziierten und der nativen Proteine in derselben Reihenfolge zunehmen. Dies ist jedoch nicht der Fall. Es ergibt sich für die Untereinheiten $DH\ I < DH\ II < DH\ III$, für die nativen Enzyme $DH\ III < DH\ I < DH\ II$. Das Elutionsvolumen bei Gelfiltration (vgl. S. 69), das ebenfalls direkt mit der Größe korreliert, ergibt die Reihenfolge $DH\ II < DH\ III < DH\ I$.

Eine Ursache für dieses Ergebnis könnte durch die verschiedenen Bestimmungsmethoden bei SDS-denaturierten und nativen Proteinen gegeben sein. Bei den durch SDS-Behandlung fadenförmigen, entknäuelten Aminosäureketten (100) ist die Exaktheit der Methode größer als bei den nativen Proteinen, deren Molekülgestalt von der der Auswertung zugrunde gelegten Idealgestalt erheblich abweichen kann (101). Außerdem wurde bei der Elektrophorese unter nicht denaturierenden Bedingungen in Polyacrylamidgradientengelen für DH I und DH II eine beträchtliche Unschärfe der Banden gefunden, während die DH III immer eine scharfe Bande ergab. Durch Berechnungen mit dem R_F -Wert für die Ober- bzw. Unterkante der Bande wird für die DH I eine Differenz im Molekulargewicht von 8500 gefunden, für die DH II sogar von 23 000. Vermutlich wird die Heterogenität der Enzyme dadurch hervorgerufen, daß unterschiedliche Mengen FAD und unterschiedliche Mengen Substrat oder Produkt gebunden sind:

Die Möglichkeit des Verlustes der prosthetischen Gruppe während der Reinigung ist für flavinhaltige Enzyme beschrieben (102). Daß die Acyl-CoA-Dehydrogenasen leicht FAD abspalten, zeigten sowohl die Versuche zur Haltbarkeit von Rohextrakten (Kap. 3.3.3., S. 57) als auch die Beobachtung, daß sich die Aktivitäten von Enzymfraktionen verschiedener Reinheitsstufen durch FAD-Zusatz steigern lassen (Kap. 3.3.5., S. 76). Das Vorkommen von grüner und gelber Form der Butyryl-CoA-Dehydrogenase (DH I) erklären Engel und Massey (51) durch unterschiedliche Mengen gebundenen CoA-Esters. Die Bildung stabiler Enzym-Substrat- bzw. Enzym-Produkt-Komplexe ist von Steyn-Parvé und Beinert beschrieben worden (41). Für die Rinderleber konnte durch Verwendung von radioaktiv markierten Acyl-CoA-Estern ebenfalls die Bindung an die Acyl-CoA-Dehydrogenasen nachgewiesen werden (Kunau und Groß, unveröffentlichte Ergebnisse).

Als weitere Hinweise auf die Existenz heterogener Formen lassen sich die Ergebnisse der isoelektrischen Focussierungen interpretieren (Kap. 3.4.2., S. 87). Durch Focussierung wird DH I in zwei aktive Proteine getrennt, DH II zeigt eine aktive Bande und mit DH III werden drei Banden erhalten, von denen nur eine aktiv ist. Die Homogenität der Proben war zuvor durch SDS-Elektrophorese festgestellt worden, jedoch kommen in diesem Verfahren unterschiedliche Beladungen der nativen Enzyme mit FAD und Acyl-CoA-Estern nicht zur Geltung, da diese Verbindungen unter denaturierenden Bedingungen abgespalten werden.

Vergleicht man die Ergebnisse der Molekulargewichtsbestimmungen und der isoelektrischen Focussierungen, so fällt auf, daß die DH III, die in der Elektrofocussierung die größte Heterogenität aufweist, im Polyacrylamidgradientengel als einzige Acyl-CoA-Dehydrogenase eine scharfe Proteinbande zeigt und daß die DH II, die nach Elektrofocussierung nur eine Bande ergibt, im Polyacrylamidgradientengel die enorm diffuse Bande mit Molekulargewichtsunterschieden von über 10 % aufweist. Dies ist jedoch nur scheinbar ein Widerspruch, da bei den beiden Methoden die Auftrennung der Proteine von unterschiedlichen Eigenschaften abhängig ist: Das Polyacrylamidgradientengel trennt nur nach Molekülgröße, die isoelektrische Focussierung nur nach Ladung. Heterogenität in der Molekülgröße und Heterogenität in der Nettoladung sind dabei nicht zwangsläufig voneinander abhängig.

Die hier dargelegte Deutung der abweichenden Ergebnisse in den Molekulargewichtsbestimmungen stellen nur Vermutungen dar unter Einbeziehung von in der Literatur beschriebenen Beobachtungen. Direkt hier einsetzende Versuche wären zur Klärung nötig. Sie sind jedoch nicht durchgeführt worden, da dieser Aspekt im Rahmen der vorliegenden Arbeit von untergeordneter Bedeutung war.

Trotz aller offenen Probleme kann als Ergebnis festgehalten werden, daß alle Acyl-CoA-Dehydrogenasen nur wenig unterschiedliche Molekulargewichte um 180 000 besitzen und jede aus vier identischen Untereinheiten aufgebaut ist.

4.4. Substratspezifität der Acyl-CoA-Dehydrogenasen

Es ist gezeigt worden (Abb. 39, S. 93), daß der Substratumsatz durch die Acyl-CoA-Dehydrogenasereaktionen der Michaelis-Menten-Kinetik folgt. Eine Hemmung durch hohe Substratkonzentrationen (bis $50 \times K_M$) konnte für keines der angebotenen Substrate festgestellt werden.

Betrachtet man die Reaktion einer Acyl-CoA-Dehydrogenase mit verschiedenen Substraten (Tab. 9, S. 92), so sieht man, daß für alle Substrate die K_M -Werte größenordnungsmäßig gleich sind; hingegen differieren die K_M -Werte eines bestimmten Substrates für die verschiedenen Acyl-CoA-Dehydrogenasen um Zehnerpotenzen: Für die DH I liegen alle K_M -Werte um 10^{-5} mol/l, für DH II um 10^{-6} mol/l und für DH III um 10^{-4} mol/l. Auch die V_{max} -Werte für die einzelnen Acyl-CoA-Dehydrogenasen unterscheiden sich erheblich.

Fettsäure-CoA-Ester, die nur mit geringen Geschwindigkeiten von einer Acyl-CoA-Dehydrogenase oxidiert werden, haben einen hemmenden Einfluß auf die Reaktion dieser Dehydrogenase mit einem schnell umgesetzten Substrat. Sie wirken, obwohl sie selber Substrate sind, wie kompetitive Hemmer. (Der Umsatz von 4:O-CoA durch DH I wird durch den Zusatz von 8:O-CoA verlangsamt (Abb. 47 A).)

Fettsäure-CoA-Ester, die von einer Acyl-CoA-Dehydrogenase nicht umgesetzt werden, beeinflussen die Reaktion dieser Dehydrogenase mit einem anderen Substrat nicht. (Der Umsatz von 4:O-CoA durch DH I wird durch die Anwesenheit von 10:O-CoA nicht ver-

langsam (Abb. 47 B).)

Entsprechende Beobachtungen wurden 1956 von Hauge (38) beschrieben, konnten aber von ihm nicht interpretiert werden.

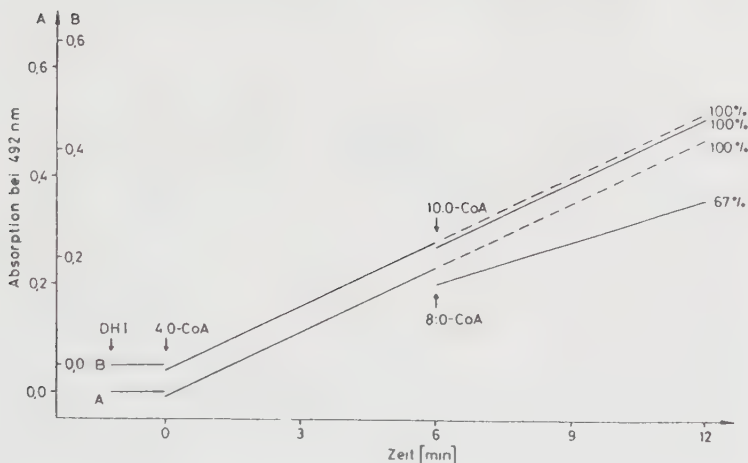


Abbildung 47: Einfluß eines zweiten Acyl-CoA-Esters auf die Acyl-CoA-Dehydrogenasereaktion.

Als Beispiel wurde der Umsatz von 4:0-CoA durch DH I dargestellt:

- A Zusatz des mit geringer Affinität umgesetzten zweiten Substrates 8:0-CoA bewirkt kompetitive Hemmung der DH I
- B Zusatz von 10:0-CoA hat keinen Einfluß, da dieser CoA-Ester kein Substrat für die DH I ist.

4.4.1. Gesättigte Acyl-CoA-Ester

In Abb. 40 (S. 94) sind die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten für die drei Acyl-CoA-Dehydrogenasen der Rinderleber

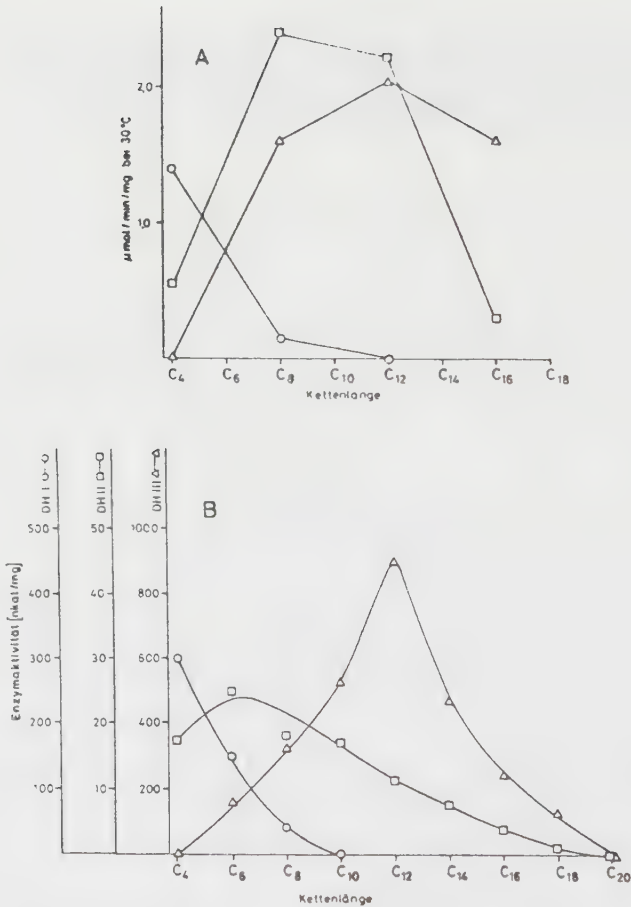


Abbildung 48: Gegenüberstellung der Substratspezifitäten der Acyl-CoA-Dehydrogenasen aus Schweine- und Rinderleber.

- A Kettenlängenspezifitäten der Schweineleberenzyme (nach Beinert (43); vgl. Abb. 20, S. 52)
- B Kettenlängenspezifitäten der Rinderleberenzyme, wie sie in der vorliegenden Arbeit gefunden wurden (vgl. Abb. 40, S. 94)

in Abhängigkeit von der Kettenlänge der Substrate aufgetragen worden. Ein entsprechendes Diagramm ist in der Literatur bislang nur für die Schweineleber gezeigt worden (37), da für kein anderes Organ und keinen anderen Organismus so umfassende Messungen vorliegen. Zum Vergleich sind die Diagramme für die Schweineleber und für die Rinderleber an dieser Stelle gegenübergestellt (Abb. 48).

Der Kettenlängenbereich derjenigen Substrate, die von einer bestimmten Acyl-CoA-Dehydrogenase umgesetzt werden, ist für die Leber beider Species annähernd gleich. Der Kurvenverlauf für DH I stimmt für Rinder- und Schweineleber sehr gut überein. Für DH II und für DH III wurden jedoch abweichende Kurvenformen erhalten: In Schweineleber hat die DH II ein breites Maximum zwischen C_8 und C_{12} , in Rinderleber ein zu geringeren Kettenlängen verschobenes Maximum bei C_6 . Die aus Schweineleber isolierte DH III weist ein breites Maximum auf, so daß die entsprechende Kurve annähernd halbkreisförmige Gestalt hat. Für die DH III der Rinderleber verläuft die Kurve in etwa glockenförmig und hat ein deutliches Maximum bei C_{12} .

Außerdem sind die absoluten Maximalgeschwindigkeiten für die drei Acyl-CoA-Dehydrogenasen der Schweineleber als größenordnungsmäßig gleich beschrieben. Sie liegen für alle drei Enzyme im Bereich von 0 - 2,25 U/mg (= 36,5 nkat/mg). Auch die K_M -Werte sind alle ungefähr gleich groß (ca. 10^{-6} mol/l).

Für die Acyl-CoA-Dehydrogenasen der Rinderleber wurden jedoch in der vorliegenden Arbeit für die entsprechenden kinetischen Daten sehr große Unterschiede gemessen, die bis zu zwei Zehnerpotenzen betragen (vgl. Tab. 9, S. 92).

Auch Osmundsen und Bremer machten ähnliche Beobachtungen (103,104): Sie maßen mit intakten Mitochondrien die durch alle Acyl-CoA-Dehydrogenasen gemeinsam bedingte Reduktion von $K_3Fe(CN)_6$ für verschiedene Species und verschiedene Organe.

Durch Auftragung der Umsatzgeschwindigkeiten gegen die Kettenlänge der Substrate erhielten sie "β-Oxidationsspektren", die in Kurvenverlauf signifikante Unterschiede aufwiesen, unter anderem auch zwischen Rinderherz und Schweineherz. Außerdem beschrieben die Autoren für die Oxidation von Fettsäuren der Kettenlänge C_{16} durch Rattenlebermitochondrien einen K_M -Wert von 10^{-4} mol/l, also in derselben Größenordnung wie der, der für die DH III aus Rinderleber in der vorliegenden Arbeit bestimmt wurde.

Aus dem Vergleich aller Daten wird deutlich, daß trotz der primär sichtbaren Gemeinsamkeiten in der Kettenlängenspezifität sehr drastische individuelle Unterschiede vorhanden sind, so daß die an einem Organ gemachten Beobachtungen nur mit Vorbehalt generalisiert werden dürfen.

Es gibt keine Befunde, die darauf hindeuten, daß die enzymatischen Reaktionen der drei Acyl-CoA-Dehydrogenasen auf unterschiedlichen Mechanismen beruhen. Es ist vielmehr anzunehmen, daß die beobachtete Selektivität durch die räumlichen Gegebenheiten und die Struktur der Aminosäuren in den aktiven Zentren hervorgerufen wird. Dabei spielen vermutlich hydrophobe Wechselwirkungen mit den unpolaren Acylresten die wichtigste Rolle.

Der hydrophobe Charakter der Substrate nimmt mit wachsender Kettenlänge zu. Der Gedanke liegt nahe, daraus eine Erklärung für die Existenz der verschiedenen kettenlängenspezifischen Acyl-CoA-Dehydrogenasen abzuleiten: Unterschiedliche physikalische Eigenschaften der Substrate würden unterschiedliche Eigenschaften der Substratbindungsstellen verlangen: diese würden bereitgestellt durch mehrere Enzyme, die für verschiedene Kettenlängenbereiche spezialisiert wären.

Die schon von den Acyl-CoA-Dehydrogenasen der Schweineleber bekannten Daten und die in der vorliegenden Arbeit mit Acyl-

CoA-Dehydrogenasen der Rinderleber erhaltenen Ergebnisse sprechen jedoch gegen diese Theorie:

1. Sowohl in Schweineleber als auch in Rinderleber existiert eine Acyl-CoA-Dehydrogenase, die DH II, die Substrate aller Kettenlängen von C_4 bis C_{18} oxidiert, die also trotz der unterschiedlich hydrophoben Acylreste alle Substrate binden kann (Abb. 48).
2. Die für die Schweineleber und in der vorliegenden Arbeit für die Rinderleber ermittelten K_M -Werte weisen für jede der Acyl CoA-Dehydrogenasen eine recht geringe Schwankungsbreite auf, d.h. die jeweilige Acyl-CoA-Dehydrogenase bindet alle ihre Substrate ungefähr gleich gut (Tab. 9, S. 92).

Für die DH II und die DH III läßt sich der Einfluß der Kettenlänge auf die Maximalgeschwindigkeit folgendermaßen beschreiben: Die DH II zeigt optimalen Umsatz mit 6:O-CoA, zunehmende Kettenlänge hat jedoch einen recht geringen Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit. Erst allmählich wird die Maximalgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion geringer, möglicherweise aus Platzgründen oder auch durch die langsamere Dissoziation des Enzym-Produkt-Komplexes, die durch die zunehmende Hydrophobie des Acylrestes bedingt werden könnte.

Für die DH III sind solche Faktoren von stärkerem Einfluß. Bei Kettenlängen $>C_{12}$ nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit mit steigender Kettenlänge sehr schnell ab. Andererseits ist auch mit sinkender Kettenlänge $<C_{12}$ eine Abnahme von V_{max} zu beobachten.

Während also für die Umsetzung des Substrats durch die DH III eine längere Alkylkette (am besten C_{12}) notwendig ist, sind für einen Umsatz mit der größten Maximalgeschwindigkeit für die DH II nur sechs C-Atome notwendig. Eine Variation in der Struktur der Alkylkette (z.B. die Gegenwart von Doppelbindungen) sollte daher auf die DH III einen stärkeren Effekt haben als auf die DH II.

Die über den gesamten Kettenlängenbereich nahezu gleichen K_M -Werte weisen darauf hin, daß die Geschwindigkeit des Substratumsatzes einen wesentlich größeren Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit hat, als die Lage des Gleichgewichts für die Substratbindung. Neben dieser Bindung an das Enzym und der dadurch wahrscheinlich erfolgenden Polarisierung am α -C-Atom (105) muß die Orientierung des Substrates zum FAD berücksichtigt werden. Für die Acyl-CoA-Dehydrogenasen wäre z.B. eine Bindung des Substrates über den CoA-Anteil denkbar, die unabhängig von der Struktur des Acylrestes erfolgen könnte. Durch diese Bindung würde eine Polarisierung am α -C-Atom bewirkt. Im folgenden Schritt, der Orientierung des so aktivierten Substrates zum FAD, hätte die chemische Natur des Acylrestes einen entscheidenden Einfluß auf die Ausbildung von intermediär entstehenden Komplexen. Konkrete Aussagen zur Struktur solcher Intermediärprodukte und zum Einfluß der Acylreste auf diese Struktur können heute noch nicht gemacht werden. Es sind zwar in den letzten Jahren viele Meßdaten und viele an Modellsubstanzen erarbeitete Vorstellungen zum möglichen Ablauf von flavinabhängigen Enzymreaktionen zusammengetragen worden (106), die Fülle und Verschiedenartigkeit der Reaktionen, in denen Flavinenzyme beteiligt sind, und die Vielfalt der Substrate mit ganz unterschiedlicher chemischer Struktur, die solchen Redoxreaktionen unterliegen, bedingen jedoch auch eine Menge verschiedener möglicher Reaktionsmechanismen (107-109). Daher ist eine Übertragung von mechanistischen Vorstellungen, die an bestimmten Flavinenzymen gewonnen wurden, auf noch nicht näher untersuchte andere Flavoproteine nicht möglich.

Während in den Reaktionen der DH II und der DH III die Reaktionsgeschwindigkeit weitgehend unabhängig von der Gleichgewichtslage des Enzym-Substrat-Komplexes ist, ist für die DH I die Substratspezifität entscheidend durch die Substratbindung beeinflusst. Hier konnte ein Umsatz nur von Substraten des begrenzten Kettenlängenbereiches C_4 bis C_8 gemessen werden, und

der in Abb. 47 dargestellte Versuch zeigt zusätzlich, daß 10:0-CoA nicht nur nicht umgesetzt, sondern gar nicht gebunden wird. Die abnehmende Umsatzgeschwindigkeit 4:0-CoA > 6:0-CoA > 8:0-CoA läßt sich gut korrelieren mit dem zunehmenden K_M -Wert (Tab. 9, S. 92)

Ein Umsatz von Acyl-CoA-Estern mit Kettenlängen $>C_{18}$ konnte bei den Acyl-CoA-Dehydrogenasen der Rinderleber nicht festgestellt werden. Hingegen soll die DH III aus Schweineleber auch Substrate mit Kettenlängen bis zu 22 C-Atomen oxidieren. Die ist jedoch nicht experimentell gezeigt worden, sondern wurde von Beinert (43) aus dem Kurvenverlauf der DH III-Aktivitäten (Abb. 48 A) gefolgert.

4.4.2. Kurzkettige ungesättigte Acyl-CoA-Ester ($<C_{10}$)

Der Umsatz ungesättigter kurzkettiger Fettsäure-CoA-Ester durch Acyl-CoA-Dehydrogenasen ließ zwar keine Hinweise auf den Abbau hochungesättigter Substrate erwarten, war aber dennoch sehr interessant aus folgenden Gründen:

Zwei kurzkettige ungesättigte Säuren erzeugen Hypoglykämie, der Hypoglycin-A-Metabolit Methylencyclopropylelessigsäure (MCPA) und die 4-Pentensäure (4-5:1-S). Beide besitzen eine (endständige) Doppelbindung am vierten Kohlenstoffatom. Als Grund ihrer hypoglykämischen Wirkung wird ein Einfluß auf die β -Oxidation angenommen (91,110).

Von MCPA ist bekannt, daß es Dehydrogenasen des Aminosäure- und Fettsäureabbaus hemmt (110). Während von Holt et al. (111) die Hemmung des Abbaues nur von längerkettigen Säuren (C_{12} - C_{18}) beschreiben, berichten Osmundsen und Sherratt (112) im Gegensatz dazu die Hemmung von Butyryl-CoA-Dehydrogenase (DH I), während Palmitoyl(Octanoyl)-CoA-Dehydrogenase (DH II oder DH III?) nicht gehemmt werden soll. Die Verlangsamung

der β -Oxidation wird auf einen Rückstau als Folge der Hemmung der Butyryl-CoA-Dehydrogenase (DH I) interpretiert. Auch Kean (76) beobachtet eine drastisch reduzierte Acyl-CoA-Dehydrogenasereaktion mit 4:O-CoA, aber keinen Einfluß auf die Reaktionen mit 8:O-CoA und 16:O-CoA; durch Studien an partiell gereinigten Acyl-CoA-Dehydrogenasen (Ammoniumsulfatfällung bei 40 - 60 % Sättigung) aus Kaninchenleber kommt Kean zu der Vermutung, daß außer der DH I eventuell auch die DH II gehemmt wird.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Messungen zeigen, daß die DH I zu 90 % und die DH II zu 67 % gehemmt wird. Die Aktivität der DH III wird durch MCPA nicht beeinflusst. MCPA wirkt nicht als substratanaloger Hemmstoff durch Konkurrenz um das aktive Zentrum, da seine Wirkung unabhängig von der Menge des eingesetzten Substrates ist. Möglich scheint eher eine Blockierung des FAD, da eine Linderung der MCPA-Vergiftung durch Riboflavin beschrieben ist (113).

Der starke Einfluß des MCPA auf die DH II konnte auch im in vivo-Versuch demonstriert werden (114): Kunau und Lauterbach zeigten, daß Ratten nach Gabe von Linolsäure und Hypoglycin A unter anderem 4c-Decen-1,2-Dicarbonsäure ausscheiden, die als durch β -Oxidation harngängig gemachtes 4c-10:1-CoA interpretiert wird (Abb. 49).

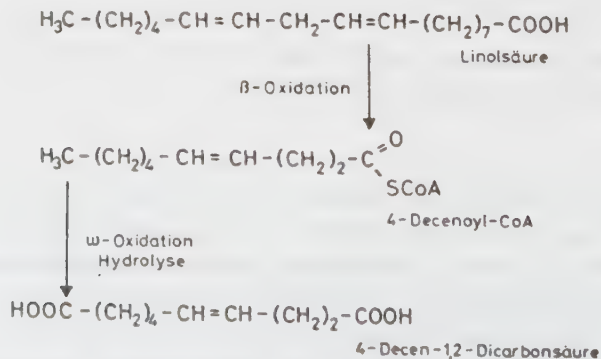


Abbildung 49: Entstehung von 4-Decen-1,2-Dicarbonsäure aus Linolsäure

Das bedeutet, daß 4c-10:1-CoA nicht zu 2t,4c-10:2-CoA oxidiert wird, daß also die DH II durch MCPA gehemmt ist. Bei Stearin- und Ölsäure taucht dieser Metabolit nicht auf. Daher ist dieser Versuch gleichzeitig ein indirekter Beweis dafür, daß 4c-10:1-CoA als Zwischenprodukt im Linolsäureabbau entsteht.

Die zweite hypoglykämisch wirkende kurzkettige Säure, die 4-Pentensäure (4-5:1-S), ähnelt der MCPA nicht nur in der hypoglykämischen Wirkung, sondern auch in der Struktur (vgl. S. 95). Daher wurde angenommen, daß dem physiologischen Effekt auch dieselbe molekulare Ursache zugrunde liegt (91). Ursprünglich glaubte man, daß beide Substanzen zwar in die CoA-Ester überführt würden, daß diese aber nicht umgesetzt würden, so daß ein Mangel an freiem CoASH für die Hemmung der β -Oxidation verantwortlich wäre (115). Diese Theorie wurde jedoch durch Holland et al. (53) verworfen, da diese den Umsatz von 4-5:1-CoA durch DH I und DH II (?) zeigen konnten. Sie beobachteten eine Hemmung der Acetoacetyl-CoA-Thiolase durch das Reaktionsprodukt 2t,4-5:2-CoA.

Durch Studien an ganzen Mitochondrien wurden widersprechende Daten erhalten, die eine Hemmung der Acetoacetyl-CoA-Thiolase bestätigen (116) bzw. eine Hemmung der β -Oxidation schon vor der Thiolasereaktion vermuten lassen (117).

Andere Autoren beschreiben den Effekt von 4-5:1-S auf die β -Oxidation als organspezifisch (118) oder finden im Herzmuskel sogar eine Stimulierung der β -Oxidation durch 4-5:1-S (119, 120). Auch die Hemmung der Gluconeogenese durch 4-5:1-S oder durch einen Metaboliten der 4-5:1-S ist als Ursache des hypoglykämischen Effektes beschrieben (121,122).

Die in dieser Arbeit mit gereinigten Acyl-CoA-Dehydrogenasen der Rinderleber gewonnenen Daten (Kap. 3.5.2., S. 96) zeigen, daß keine der drei Acyl-Dehydrogenasen durch 4-5:1-CoA ge-

hemmt wird. 4-5:1-CoA wird von DH III nicht oxidiert, während es von DH I und DH II als Substrat umgesetzt wird. Die Bildung von 2t,4-5:2-CoA konnte für diese Acyl-CoA-Dehydrogenasen durch Messung der Absorptionszunahme bei 296 und 492 nm gezeigt werden.

Die Konkurrenz von 4-5:1-CoA mit anderen Substraten um den Substratbindungsort konnte durch Messungen bei 296 nm bewiesen werden: Die Bildung von 2t,4-5:2-CoA wurde verlangsamt, sobald ein zweites Substrat zugesetzt wurde (Kap. 3.5.2., S.96).

Diese Ergebnisse zeigen, daß die hypoglykämische Wirkung von Methylencyclopropyllessigsäure und von 4-Pentensäure auf unterschiedlichen molekularen Ursachen beruht. Während MCPA als Inhibitor auf die DH I und DH II wirkt, ist ein Einfluß des 4-5:1-CoA auf die Acyl-CoA-Dehydrogenasen nur insofern zu beobachten, als es als Substrat der DH I und der DH II mit anderen Acyl-CoA-Estern um die Enzyme konkurrieren kann.

4.4.3. Mittel- und langkettige ungesättigte Acyl-CoA-Ester ($>C_8$)

Die Messungen an ungesättigten isomeren Acyl-CoA-Estern der Kettenlänge C_{10} haben gezeigt, daß Doppelbindungen den Umsatz durch DH II nicht beeinflussen. Dies entspricht den Erwartungen, die sich aus den oben dargelegten Überlegungen zu diesem Enzym ergaben (vgl. S.129). Danach sollte die Art des Acylrestes nur geringen Einfluß auf die Umsetzung der Substrate haben. Größere Auswirkungen wurden auf die DH III erwartet und auch bestätigt: Die Umsetzungsgeschwindigkeit für 4c-10:1-CoA und für 4c,7c-10:2-CoA beträgt nur 2 bzw. 4 % derjenigen des gesättigten 10:0-CoA-Esters.

Das Vorhandensein der Doppelbindung(en) allein kann jedoch nicht der Grund für den geringen Umsatz sein, der Position der Doppelbindung muß eine entscheidende Rolle zukommen, denn

5c-10:1-CoA und 6c-10:1-CoA werden von der DH III ebenso gut wie 10:0-CoA oxidiert (Abb. 41, S. 97). Jedoch unterscheiden sich die K_M -Werte für die 4c-ungesättigten Verbindungen nicht von den Werten für 5c-10:1-CoA und 6c-10:1-CoA, alle Substrate werden gleich gut gebunden. Daß die 4c-ungesättigten Verbindungen fast nicht umgesetzt werden, hat möglicherweise seine Ursache in der Schwierigkeit, die 2t-Doppelbindung in Konjugation zu zwei schon vorhandenen Doppelbindungen (Thioestergruppierung und 4c-Doppelbindung) einzuführen und dadurch ein bis zum fünften C-Atom starres System auszubilden. Diese Annahme wird gestützt durch Messungen mit 4-Decinoyl-CoA: Durch die starre Anordnung der Dreifachbindung einschließlich der benachbarten C-Atome besteht im Substrat ein vom dritten bis zum sechsten Kohlenstoffatom lineares unbewegliches System. Hier konnte keine Oxidation durch die DH III nachgewiesen werden. Von Bernhard et al. konnte in in vivo-Versuchen wahrscheinlich gemacht werden, daß auch Fettsäuren mit einer Dreifachbindung in Position 5 nicht oder nur sehr langsam durch β -Oxidation abgebaut werden können (123,124).

Nachdem sich herausgestellt hatte, daß die Einführung der 2t-Doppelbindung in 4c-ungesättigte Substrate prinzipiell möglich ist, daß 4c-10:1-CoA und 4c,7c-10:2-CoA jedoch fast ausschließlich durch die DH II oxidiert werden, wurde versucht, diesen Befund mit hochungesättigten Substraten zu überprüfen. 5,8,11,14-20:4-CoA (Arachidonyl-CoA) und 4,7,10,13-22:4-CoA wurden jedoch weder von der DH II noch von der DH III umgesetzt. Auch mit den korrespondierenden gesättigten Substraten 20:0-CoA und 22:0-CoA wurde keine Oxidation gemessen.

Das Ergebnis steht im Widerspruch zu dem bekannten Befund, daß 5,8,11,14-20:4-S in vivo zu CO_2 abgebaut wird (19) und daß die Kettenverkürzung im partiellen Abbau hochungesättigter Fettsäuren ebenfalls durch β -Oxidation erfolgt (125). Die in vitro-Reaktion muß aus irgendeinem Grund gehindert sein. Möglich wäre, daß für die langkettigen Säuren eine vierte Acyl-CoA-

Dehydrogenase existiert, die in dem verwendeten Rohextrakt nicht vorhanden, nicht aktiv oder mit den angewendeten Methoden nicht meßbar ist. Es wäre auch denkbar, daß für diese schlecht wasserlöslichen CoA-Ester ein besonderer Carrier benötigt wird. Ein Albuminzusatz, wie ihn Hall et al. (55) für die Reaktion des 6:0-CoA mit der DH II aus Rinderherz beschreiben, brachte jedoch für die hier diskutierten Messungen keine Änderung.

In die bis heute offene Diskussion um den Abbau der langkettigen Fettsäuren ($>C_{18}$) ist in der jüngsten Literatur ein weiterer Aspekt eingebracht worden: Es wird ein β -Oxidationssystem in den Peroxisomen beschrieben, das neben 2-Enoyl-CoA-Hydratase, 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase und β -Ketoacyl-CoA-Thiolase anstelle einer Acyl-CoA-Dehydrogenase eine Acyl-CoA-Oxidase enthält (126,127). Diese Acyl-CoA-Oxidase führt wie die Acyl-CoA-Dehydrogenase der Mitochondrien in gesättigte Fettsäure-CoA-Ester eine 2t-Doppelbindung ein. Sie ist aber nicht an ein Elektronentransportsystem gekoppelt, sondern überträgt die Elektronen unter H_2O_2 -Bildung direkt auf den Sauerstoff (128). Lazarow vermutet, daß dieses β -Oxidationssystem für langkettige Fettsäuren spezialisiert ist (129), da Butyryl-CoA nicht umgesetzt wird und nur fünf Mole H_2O_2 pro Mol Palmityl-CoA gefunden wurden. Längerkettige Säuren ($>C_{16}$) wurden jedoch nicht angeboten.

Die zitierten Arbeiten wurden mit sorgfältig von den Mitochondrien abgetrennten Peroxisomen durchgeführt. Die Mitochondrienpräparationen, die für die vorliegende Arbeit zur Acetontropkenpulverdarstellung verwendet wurden, enthielten auch die Peroxisomenfraktion. Andererseits muß davon ausgegangen werden, daß mit dem ausgearbeiteten Enzymtest nur die aus Mitochondrien bekannten Acyl-CoA-Dehydrogenasen erfaßt werden. Das würde sowohl die niedrigen Enzymaktivitäten mit 16:0- und 18:0-CoA erklären als auch den fehlenden Umsatz von längerkettigen Fettsäuren. In diesem Zusammenhang muß die intrazelluläre

Lokalisation des partiellen Abbaus hochungesättigter Fettsäuren neu überdacht werden.

Da mit den langkettigen Substraten keine Daten für die Rolle der 4c-Doppelbindung in hochungesättigten Acyl-CoA-Estern zu erhalten waren, wurde ein anderes Substrat ausgewählt, das eine Zwischenstellung zwischen 4c-10:1-CoA und 4,7,10,13-22:4-CoA einnimmt: der 4,7,10,13-16:4-CoA-Ester. Dieser gleicht der langkettigen Säure in der Anzahl und Position der Doppelbindungen, aufgrund der Kettenlänge C_{16} sollte aber die Oxidation möglich sein, wie für 16:0-CoA gezeigt wurde (Abb. 21, S.53, Abb. 40, S. 94 und Abb. 42, S.100). 4,7,10,13-16:4-CoA wird von beiden Acyl-CoA-Dehydrogenasen DH II und DH III zu 2t,4,7,10,13-16:5-CoA umgesetzt, wie die Messungen bei 296 nm belegen. Für die DH II entsprechen K_M - und V_{max} -Wert den Daten für den Umsatz von 16:0-CoA, die durch die Doppelbindung stark veränderte Molekülstruktur hat keinen Einfluß auf die Reaktion. Die DH III ist zwar ebenfalls in der Lage, 4,7,10,13-16:4-CoA zu oxidieren, V_{max} beträgt aber nur ca. 20 % im Vergleich zu 16:0-CoA und nur 3 % im Vergleich zum optimalen Substrat 12:0-CoA.

Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den Ergebnissen, die an den Substraten der Kettenlänge C_{10} gewonnen wurden: Während die DH II zwischen gesättigten und 4c-ungesättigten Substraten nicht unterscheidet, ist bei der DH III der Umsatz der Verbindungen 4c-10:1-CoA und 4c,7c-10:2-CoA nahezu vollständig verhindert.

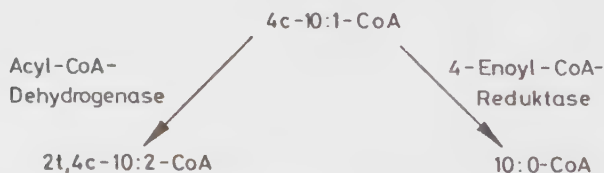
4.5. Rolle der Acyl-CoA-Dehydrogenasen im Abbau von Linol- und Linolensäure

Da DH III 4c-10:1-CoA und 4c,7c-10:2-CoA im Vergleich zu allen anderen Substraten nur mit minimalen Geschwindigkeiten oxidiert, ist für diese Reaktion die DH II unbedingt notwendig, d.h., DH II spielt eine entscheidende Rolle im Abbau der Linol-

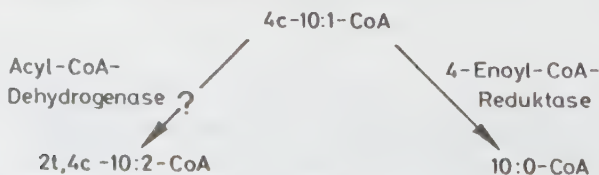
und Linolensäure. Ebenso müssen alle Säuren der Linol- und Linolensäurefamilie diese Zwischenstufe durchlaufen, so daß ein Großteil der ungesättigten langkettigen Fettsäuren ebenfalls auf die Oxidation durch die DH II angewiesen ist. Auch die anderen Fettsäuren mit Doppelbindungen an geradzahligen C-Atomen werden durch β -Oxidation schließlich in entsprechende 4c-ungesättigte Zwischenprodukte umgewandelt. Hier könnte allerdings neben der Reaktion der DH II auch eine stärkere Beteiligung der DH III am weiteren Umsatz vorliegen, wie es in Kap. 3.5.5. (S.99) für 4,7,10,13-16:4-CoA gezeigt worden ist.

In der Einleitung wurde das von Kunau und Bartnik nachgewiesene Enzym 4-Enoyl-CoA-Reduktase beschrieben und die Diskussion um seine Rolle im Linolsäureabbau dargestellt (S.4 - 6).

Eine Reaktionssequenz, in die dieses Enzym integriert ist, wurde dem allgemein akzeptierten Abbauschema von Stoffel gegenübergestellt (Abb. 4, S. 5). Hier lauten die alternativen Möglichkeiten für den Umsatz von 4c-10:1-CoA:

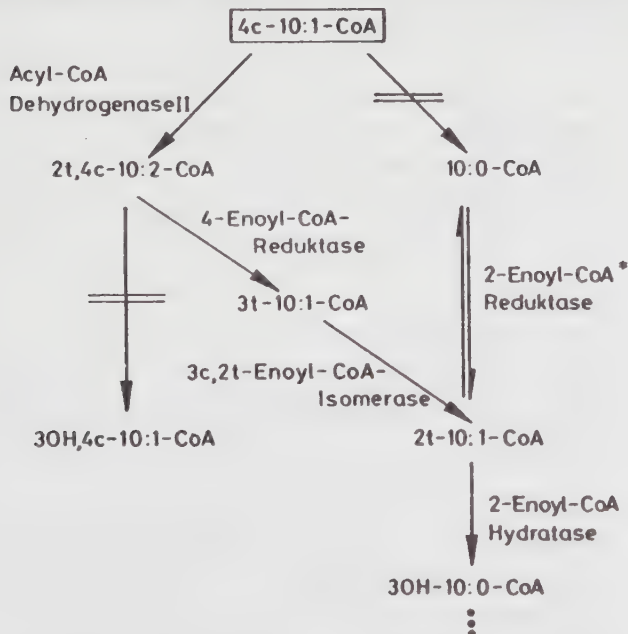


Die vorliegende Arbeit ist durchgeführt worden, um zu klären, ob Acyl-CoA-Dehydrogenasen 4c-10:1-CoA zu 2t,4c-10:2-CoA oxidieren können, oder ob durch die unmittelbare Nachbarschaft der 4c-Doppelbindung die Reaktion durch sterische oder mechanistische Gründe verhindert wird. Dann würde die Reduktion zu 10:0-CoA den weiteren Abbau durch β -Oxidation ermöglichen. Die Arbeitshypothese lautete also:



Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse über die Substratspezifitäten der Acyl-CoA-Dehydrogenasen aus Rinderleber haben eindeutig gezeigt, daß 4c-10:1-CoA zu 2t,4c-10:2-CoA oxidiert wird. Es hätte also eine Konkurrenz zwischen Acyl-CoA-Dehydrogenase und 4-Enoyl-CoA-Reduktase um 4c-10:1-CoA gefolgt werden müssen.

Durch Ergebnisse von Kunau und P. Dommès an 4-Enoyl-CoA-Reduktase aus Rinderleber (29) und von P. Dommès an 4-Enoyl-CoA-Reduktase aus Hefe (*Candida tropicalis*) (84) konnte jedoch in Verbindung mit der vorliegenden Arbeit die Reaktionsfolge für die β -Oxidation von 4c-10:1-CoA folgendermaßen aufgeklärt werden:



* 10:0-CoA entsteht in vitro aus 2t-10:1-CoA unter NADPH-Verbrauch durch die von Podack und Seubert beschriebene 2-Enoyl-CoA-Reduktase (130), wenn die β -Oxidation des gebildeten 2t-10:1-CoA durch die Inkubationsbedingungen (Mangel an NAD^+ und CoASH) nicht oder nur sehr langsam ablaufen kann.

Damit ist gezeigt, daß die isolierte Doppelbindung in Position 4 nicht reduziert wird, aber auch, daß keine Kettenverkürzung unter Erhalt der Doppelbindung stattfindet. Stattdessen erfolgt durch die Acyl-CoA-Dehydrogenase II die Einführung der 2t-Doppelbindung. Das so ausgebildete konjugierte System bewirkt eine Polarisierung der vorhandenen 4c-Doppelbindung. Dadurch werden zwei Effekte erzielt: die Reduktion der 4c-Doppelbindung durch die 4-Enoyl-CoA-Reduktase wird ermöglicht und die Wasseranlagerung an die 2t-Doppelbindung mitten im konjugierten System wird verhindert. Es entsteht nach Isomerisierung des Reduktionsproduktes der 2t-10:1-CoA-Ester, ein Zwischenprodukt des β -Oxidationszyklus, wodurch der Wiedereinstieg in die klassische Reaktionssequenz der β -Oxidation erreicht wird (Abb. 50).

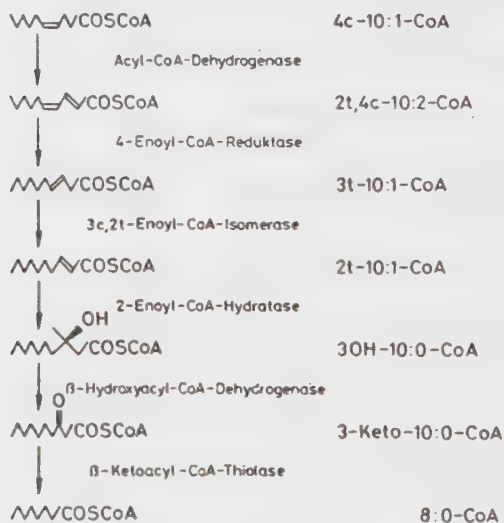


Abbildung 50: Aufgrund der neuen Ergebnisse korrigiertes Abbau-
schema für den Linolsäure-Metaboliten
4c-10:1-CoA.

Es ist erstaunlich, daß diese chemisch einleuchtende und zu fordernde Reaktionsfolge in der Diskussion um die Sequenz des partiellen Abbaus nie in Erwägung gezogen wurde. Der Grund hierfür liegt sicherlich darin, daß der β -Oxidationszyklus immer als funktionelle Einheit gesehen wurde, obwohl über die strukturelle Organisation der Enzyme (z.B. an der Mitochondrienmembran fixiert oder als Multienzymkomplex in der Matrix) bis heute nichts Sicheres bekannt ist.

Der Schritt von der Modells substanz 4c-10:1-CoA zurück zu den hochungesättigten Fettsäuren und zur Rolle der 4-Enoyl-CoA-Reduktase im partiellen Abbau ist durch die Entdeckung der β -Oxidation in den Peroxisomen erschwert worden. Es muß überprüft werden, ob dieser Abbauweg wirklich in den Mitochondrien oder vielleicht in den Peroxisomen stattfindet. Dann wäre für diese Organellen eine eigene 4-Enoyl-CoA-Reduktase zu fordern. Aus den oben diskutierten Gründen muß man annehmen, daß auch im partiellen Abbau die Reduktion der 4c-Doppelbindung eingeleitet wird durch die Einführung der 2t-Doppelbindung, die durch Ausbildung des konjugierten Systems den Reduktionsschritt ermöglicht.

Um konkrete Aussagen über das Zusammenwirken der beiden Acyl-CoA-Dehydrogenasen DH II und DH III machen zu können, müßte die Beteiligung dieser beiden Enzyme am Abbau langkettiger Fettsäuren *in vivo* bekannt sein.

Die Errechnung des Mengenverhältnisses von DH II zu DH III in frischer Leber aus den in dieser Arbeit bestimmten spezifischen Aktivitäten der gereinigten Enzyme (Tab. 3, S. 56) gegenüber den Substraten 4c-10:1-CoA (DH II) und 10:0-CoA (DH III) würde voraussetzen, daß die isolierten Enzyme volle Aktivität besitzen und nicht teilweise inaktiviert vorliegen. Da die Messung der Enzymaktivitäten auf unphysiologischen Reaktionen mit künstlichen Elektronenakzeptoren beruht, ist außerdem nicht auszuschließen, daß die gemessenen Aktivitäten nicht die in

vivo-Verhältnisse widerspiegeln (38). Zudem ist unbekannt, wie hoch das Substratangebot in den Mitochondrien ist, so daß die in die Tests eingesetzten Mengen völlig willkürlich sind.

Trotzdem zeigen die Messungen eindeutig, daß 1. verschiedene Enzyme für dasselbe Substrat vorhanden sind, 2. diese Enzyme unter den gewählten identischen Testbedingungen stark unterschiedliche K_M -Werte aufweisen und 3. 4c-ungesättigte C_{10} -Säuren fast ausschließlich von der DH II umgesetzt werden. Diese Befunde provozieren die Frage nach einer Erklärung. Es wurden bereits experimentelle Daten angeführt, die zeigen, daß die Notwendigkeit mehrerer Acyl-CoA-Dehydrogenasen nicht auf unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften der lang- und kurzkettigen Substrate beruht.

Eine mögliche Erklärung wäre die unterschiedliche Lokalisierung der beiden Enzyme, z.B. analog den beiden Thiolasen: die mitochondriale β -Ketoacyl-CoA-Thiolase ist Bestandteil der β -Oxidation und setzt aus β -Ketoacyl-CoA Acetyl-CoA frei (15, 59), während die cytoplasmatische Acetoacetyl-CoA-Thiolase die erste Reaktion zur Cholesterinbiosynthese katalysiert, also die Synthese von Acetoacetyl-CoA aus zwei Acetyl-CoA (131,132). Die Wahrscheinlichkeit, daß es sich bei DH II und DH III z.B. um eine mitochondriale und eine peroxisomale Acyl-CoA-Dehydrogenase handelt, ist allerdings gering, da beide Enzyme mit dem künstlichen Elektronenakzeptorsystem reagieren, d.h. also, daß beide an ein Elektronentransportsystem gekoppelt sind und nicht mit Sauerstoff direkt reagieren. Das widerspricht Befunden von Osumi und Lazarow (128,129), die in Peroxisomen eine O_2 -abhängige Acyl-CoA-Oxidase beschreiben. Wenn die beiden Acyl-CoA-Dehydrogenasen nicht unterschiedlich lokalisiert sind, so daß in vivo für beide Enzyme dieselben Substratkonzentrationen vorliegen, besteht die Möglichkeit, daß in Abhängigkeit von der Stoffwechselsituation eine stetig aber langsam bei geringen Substratkonzentrationen ablaufende Oxidation durch DH II ($K_M = 10^{-6}$ mol/l) und eine bei hohen Substratkonzentrationen mit sehr

viel höherer Geschwindigkeit stattfindende Oxidation durch DH III ($K_M = 10^{-4}$ mol/l) zu unterscheiden ist. Eine entsprechende Situation ist in der Leber für die Phosphorylierung der Glucose durch Hexokinase ($K_M = 10^{-5}$ mol/l) und Glucokinase ($K_M = 10^{-2}$ mol/l) bekannt (133).

In diesen von Walker beschriebenen Untersuchungen (133) wird auch auf signifikante Unterschiede zwischen Wiederkäuern und nicht wiederkauenden Tieren hingewiesen: Die niedrigaffine Glucokinase findet sich bei Wiederkäuern nicht. Vielleicht ergibt sich hieraus ein weiterer Hinweis auf die Unterschiede von den in der Literatur beschriebenen K_M -Werten der Acyl-CoA-Dehydrogenasen der Schweineleber und den in der vorliegenden Arbeit gefundenen Werten für die Acyl-CoA-Dehydrogenasen der Rinderleber (vgl. Kap. 4.4.1., S. 125).

Verfolgt man den Gedanken einer stetig langsam arbeitenden DH II und einer nur bei hohen Substratkonzentrationen schnell arbeitenden DH III weiter und fragt nach den daraus entstehenden Konsequenzen, so ergibt sich folgende Interpretationsmöglichkeit:

Die Umsetzung von 4c-10:1-CoA und 4c,7c-10:2-CoA nur durch DH II mit niedrigen Aktivitäten bedeutet einen Schutz der Linol- und Linolensäure vor schneller β -Oxidation, da diese Säuren als essentielle Bausteine der Phospholipide der Membranen eine wichtige Funktion haben. Bei einer genügend guten Versorgung mit anderen Fettsäuren ist der Abbau dieser Säuren zur Energiegewinnung nicht notwendig und kann dadurch selektiv verlangsamt werden, daß 4c-10:1-CoA und 4c,7c-10:2-CoA von der in dieser Stoffwechselsituation aktiven DH III kaum umgesetzt werden.

Ähnliche Beobachtungen wurden von Bernhard und Mitarbeitern gemacht:

1. Wagner, Seelig und Bernhard untersuchten die Verweilzeit von

Linolsäure in der Ratte und stellten eine ungewöhnlich lange Halbwertszeit von 68 Tagen gegenüber 22 Tagen für z.B. Erucasäure fest (134).

2. Bernhard und Mitarbeiter verfütterten verschiedene Fettsäuren mit Dreifachbindungen und fanden immer Metabolite der Kettenlänge C_{10} im Harn: Stearolsäure (9-18¹-S) (123) und Behenolsäure (13-22¹-S) (124) ergaben 5-Decin-1,10-Dicarbonsäure, aus Taririnsäure (6-18¹-S) entstand 4-Decen-6in-Dicarbonsäure (135) und aus Crespissäure (9c,12in-18:2-S) wurde 4-Decin-1,10-Dicarbonsäure gebildet (136). Die Bildung solcher Säuren der Kettenlänge C_{10} wird als "partiell gehemmte β -Oxidation" bezeichnet (136).

Nach den in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnissen werden 4-Decinsäuren zwar durch DH II oxidiert, die nachfolgende Umsetzung der 2t,4in-Produkte durch die 4-Enoyl-CoA-Reduktase ist jedoch vollständig gehemmt (Kunau, unveröffentlichte Ergebnisse). Die 2-Enoyl-CoA-Reduktase (130) kann die Rückverwandlung der Produkte zu 4in-Säuren bewirken (Kunau und Cvetanović, unveröffentlichte Ergebnisse).

Sowohl die von Bernhard untersuchten Säuren als auch die Linol- und Linolensäure werden zu mittelkettigen Zwischenprodukten abgebaut. Solche Zwischenprodukte können offensichtlich die Mitochondrien verlassen. Die von Bernhard beschriebenen acetylenischen Säuren werden an den Mikrosomen durch ω -Oxidation zu den Dicarbonsäuren umgesetzt, die als Glycin-Konjugate im Harn ausgeschieden werden.

4c-10:1-CoA und 4c,7c-10:2-CoA könnten ebenfalls an die Mikrosomen gelangen, wo z.B. eine Resynthese stattfinden könnte. Hierbei würde durch Kettenverlängerung zu C_{18} und die Einführung der Doppelbindung in Position 9 die Linol- bzw. Linolensäure zurückgewonnen.

Es ist heute allgemein akzeptiert, daß eine Resynthese aus Intermediärprodukten der β -Oxidation nicht stattfindet und

daß ungesättigte Fettsäuren ebenso schnell wie die gesättigten abgebaut werden (137). Grundlage für diese Erkenntnis bilden eine Reihe verschiedener Versuche:

- a) Aus [$1\text{-}^{14}\text{C}$]-markierten gesättigten und ungesättigten Fettsäuren wird im in vivo-Versuch gleich schnell $^{14}\text{CO}_2$ freigesetzt (138).
- b) Auch aus ungesättigten Fettsäuren, die im Methylen- markiert sind ([$13\text{-}^{14}\text{C}$] und [$15\text{-}^{14}\text{C}$]) (139-141), wird $^{14}\text{CO}_2$ abgeatmet.
- c) Nach Verfütterung von doppelt markierten ungesättigten Fettsäuren, ([$1\text{-}^{14}\text{C}$] und im Methylen [^3H]) weisen die nach 4-7 Stunden isolierten ungesättigten Fettsäuren dasselbe Isotopenverhältnis $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ auf wie die verfütterten Säuren. Das wird als Beweis dafür angesehen, daß keine Resynthese dieser Säuren aus Intermediärprodukten stattfindet (19).

Zu diesen Befunden sind folgende Anmerkungen zu machen:

Die Versuche unter a) lassen keine Aussage über die Geschwindigkeit des vollständigen Abbaus zu.

Da keine Kontrollversuche mit gesättigten Fettsäuren berichtet werden, ist auch bei den unter b) beschriebenen Versuchen keine Aussage über die relative Abbaugeschwindigkeit möglich. Es finden sich aber andere wichtige Hinweise, die auf ungleiche Abbauraten hinweisen: 1. Obwohl keine Linolsäure gefüttert wurde, ist die Menge der isolierten Arachidonsäure für fettfrei ernährte Ratten und Kontrolltiere gleich. 2. Stellungsisomere Linol- und Linolensäuren (8,11-18:2-S; 10,13-18:2-S und 8,11,14-18:3-S) werden rasch abgebaut, während die essentiellen Säuren 9,12-18:2-S und 9,12,15-18:3-S als solche oder kettenverlängert in die Lipide der Membranen eingebaut werden.

Die unter c) beschriebenen Versuchsergebnisse lassen sich nicht eindeutig interpretieren, da Angaben über die Ernährung der Versuchstiere in der Versuchsbeschreibung nicht gegeben

wurden. Bei fettarm ernährten Tieren könnte eine Stoffwechselsituation vorgelegen haben, in der nur die DH II aktiv war. Diese Acyl-CoA-Dehydrogenase unterscheidet jedoch gemäß den in der vorliegenden Arbeit gemessenen Daten nicht zwischen 10:0-CoA und 4c-10:1-CoA, so daß Linol- und Stearinsäure tatsächlich gleich schnell abgebaut werden müssen und keine Resynthese aus aufgestauten Zwischenprodukten erwartet werden kann.

Außerdem muß in diesem Zusammenhang nochmals auf die oben schon erwähnten Versuche von Wagner et al. erinnert werden (134), in denen für Linolsäure eine ungefähr dreimal so lange Halbwertszeit im Organismus gefunden wurde wie für andere langkettige Fettsäuren.

Die in der Literatur beschriebenen experimentellen Daten widersprechen nicht den hier diskutierten Überlegungen zur Bedeutung der beiden unterschiedlichen Acyl-CoA-Dehydrogenasen DH II und DH III im Abbau der essentiellen Fettsäuren.

Zur experimentellen Untermauerung müssen eine Reihe von Versuchen angeschlossen werden. So hat die in der vorliegenden Arbeit vorrangig untersuchte Teilreaktion, die Oxidation von 4c-10:1-CoA zu 2t,4c-10:2-CoA eine Menge noch ungeklärter Fragen innerhalb eines vermeintlich aufgeklärten Kapitels des Intermediärstoffwechsels aufgezeigt.

5. Zusammenfassung

1. Die Unzulänglichkeiten der in der Literatur beschriebenen Methoden zur Messung von Acyl-CoA-Dehydrogenaseaktivitäten wurde aufgezeigt. Eine verlässliche kontinuierliche photometrische Bestimmung wurde möglich durch die Übertragung eines Systems, das bislang nur für NAD(P)-abhängige Enzyme bekannt war.
2. Die analytische Differenzierung der verschiedenen Acyl-CoA-Dehydrogenasen wurde durch spezifische Anfärbung nach Trennung der nativen Proteine im Polyacrylamidgel erreicht.
3. In Rinderleber wurden drei unterschiedliche Acyl-CoA-Dehydrogenasen nachgewiesen.
4. Es wurden verschiedene in der Literatur für Acyl-CoA-Dehydrogenasen beschriebene Proteintrennungsv Verfahren auf ihre Effektivität zur Trennung der drei Acyl-CoA-Dehydrogenasen der Rinderleber voneinander untersucht. Dies war durch die ausgearbeiteten analytischen Kontrollmethoden möglich. Durch optimale Kombination der einzelnen Reinigungsschritte gelang die Trennung der Acyl-CoA-Dehydrogenasen voneinander und ihre Reinigung von Fremdproteinen.
5. Es wurden pH- und Temperaturoptima bestimmt und die drei Acyl-CoA-Dehydrogenasen durch Molekulargewichte und isoelektrische Punkte charakterisiert.
6. Es wurde gezeigt, daß die drei Acyl-CoA-Dehydrogenasen der Rinderleber in ihren Kettenlängenspezifitäten den drei Acyl-CoA-Dehydrogenasen der Schweineleber entsprechen. Es wurden jedoch große Unterschiede in den Enzymaktivitäten gefunden.
7. Es wurden Untersuchungen mit ungesättigten Substraten verschiedener Kettenlängen durchgeführt. Dabei wurde gezeigt, daß die beiden hypoglykämischen Substanzen 4-Pentensäure

und Methylencyclopropylessigsäure nicht über denselben Mechanismus wirksam werden.

Es wurde weiterhin gezeigt, daß in ungesättigten Fettsäuren die Doppelbindungen keinen Einfluß auf die kinetischen Daten der Enzymreaktionen haben. Eine Ausnahme bilden die 4cis-, 4in- und 5in-Säuren, die von der DH III nur mit ganz geringen Geschwindigkeiten bzw überhaupt nicht umgesetzt werden. Dadurch wurde 4c-10:1-CoA als spezifisches Substrat für die DH II erkannt.

Außerdem wurde gezeigt, daß keine der drei Acyl-CoA-Dehydrogenasen Fettsäuren mit Kettenlängen über 18 C-Atome oxidiert. Dieser Befund wurde in Hinsicht auf den partiellen Abbau diskutiert.

Der Nachweis der Oxidation von 4c-ungesättigten Fettsäuren durch DH II führte zur Aufklärung der 4-Reduktase-Reaktion und zur Klärung des Linolsäureabbaus. Die Bedeutung des Umsatzes von 4c-10:1-CoA nur durch DH II wurde diskutiert.

Literaturverzeichnis

- (1) F. Knoop (1905) Beitr. Chem. Physiol.Pathol. 6, 150-162
- (2) F. Lynen, E. Reichert und L. Rueff (1951) Ann. Chem. 574, 1 - 32
- (3) F. Lynen, L. Wessely, O. Wieland und L. Rueff (1952) Angew. Chemie 64, 687
- (4) G. R. Drysdale und H. A. Lardy (1953) J. Biol. Chem. 202, 119 - 136
- (5) F. Lynen (1952/53) Harvey Lect. 48, 210 - 244
- (6) F. Lynen (1955) Ann. Rev. Biochem. 24, 653 - 688
- (7) F. Lynen (1955) Angew. Chem. 67, 463 - 470
- (8) D. E. Green, S. Mii, H. R. Mahler und R. M. Bock (1954) J. Biol. Chem. 206, 1 - 12
- (9) F. L. Crane, S. Mii, J.G. Hauge, D. E. Green und H. Beinert (1956) J. Biol. Chem. 218, 701 - 715
- (10) J. G. Hauge, F. L. Crane und H. Beinert (1956) J. Biol. Chem. 219, 727 - 733
- (11) J. R. Stern, A. Del Campillo und I. Raw (1956) J. Biol. Chem. 218, 971 - 983
- (12) S. J. Wakil und H. R. Mahler (1954) J. Biol. Chem. 207, 125 - 132
- (13) S. J. Wakil, D. E. Green, S. Mii und H. R. Mahler (1954), J. Biol. Chem. 207, 631 - 638
- (14) J. R. Stern (1957) Biochem. Biophys. Acta 26, 448 - 449
- (15) J. R. Stern (1955) in "Methods in Enzymology" (S. P. Colowick und N. O. Kaplan, Hrsg.) Bd. 1, S. 573 - 581, Acad. Press, New York
- (16) W. Stoffel, R. Ditzer und H. Caesar (1964) Z. Physiol. Chem. 339, 167 - 181
- (17) W. Stoffel, H. Caesar und R. Ditzer (1964) Z. Physiol. Chem. 339, 182 - 193

- (18) W. Stoffel und H. Caesar (1965) Z. Physiol. Chem. 341, 76 - 83
- (19) W. Stoffel und H.-G. Schiefer (1965) Z. Physiol. Chem. 341, 84 - 90
- (20) H. Sprecher (1967) Biochim. Biophys. Acta 144, 296 - 304
- (21) B. Verdino, M. L. Blank, O. S. Privett und W. O. Lundberg.(1964) J. Nutrition 83, 234 - 238
- (22) H. Schlenk, J. L. Gellerman und D. M. Sand (1967) Biochim. Biophys. Acta 137, 420 - 426
- (23) W.-H. Kunau (1968) Z. Physiol. Chem. 349, 333 - 338
- (24) H. Schlenk, D. M. Sand und J. L. Gellerman (1969) Biochim. Biophys. Acta 187, 201 - 207
- (25) W.-H. Kunau und B. Couzens (1971) Z. Physiol. Chem. 352, 1297 - 1305
- (26) W. Stoffel, W. Ecker, H. Assad und H. Sprecher (1970) Z. Physiol. Chem. 351, 1545 - 1554
- (27) W.-H. Kunau und F. Bartnik (1974) Eur. J. Biochem. 48, 311 - 318
- (28) F. Bartnik (1975) Dissertation, Bochum
- (29) W.-H. Kunau und P. Dommes (1978) Eur. J. Biochem. 91, 533 - 544
- (30) H.D. Dakin (1909) J. Biol. Chem. 6, 203 - 219
- (31) Hurtley (1916) Quart. J. Med. 9, 301 (zitiert in (33))
- (32) M. Jowett und J. H. Quastel (1935) Biochem. J. 29, 2143 - 2158
- (33) A. Kleinzeller (1943) Biochem. J. 37, 678 - 682
- (34) F. P. Mazza (1943) Ergebn. Enzymforsch. 9, 207 - 230
- (35) W. Seubert und F. Lynen (1953) J. Am. Chem. Soc. 75, 2787 - 2788
- (36) H. R. Mahler (1954) J. Biol. Chem. 204, 13 - 26

- (37) F. L. Crane, J. G. Hauge und H. Beinert (1955) *Biochim. Biophys. Acta* 17, 292 - 294
- (38) J. G. Hauge (1956) *J. Am. Chem. Soc.* 78, 5266 - 5272
- (39) H. Beinert (1957) *J. Biol. Chem.* 225, 465 - 478
- (40) H. Beinert und E. Page (1957) *J. Biol. Chem.* 225, 479 - 497
- (41) E. P. Steyn-Parvé und H. Beinert (1958) *J. Biol. Chem.* 233, 843 - 852
- (42) E. P. Steyn-Parvé und H. Beinert (1958) *J. Biol. Chem.* 233, 853 - 861
- (43) H. Beinert (1962) in "Methods in Enzymology" (S. P. Colowick und N. O. Kaplan, Hrsg.) Bd. 5, S. 546 - 557, Acad. Press, New York
- (44) H. Beinert (1963) in "The Enzymes" (P. D. Boyer, H. A. Lardy und K. Myrbäck, Hrsg.) 2. Auflage, Bd. 7, S. 447 - 466, Acad. Press, New York
- (45) F. L. Crane und H. Beinert (1956) *J. Biol. Chem.* 218, 717 - 731
- (46) F. J. Ruzicka und H. Beinert (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 66, 622 - 631
- (47) F. J. Ruzicka und H. Beinert (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 8440 - 8445
- (48) A. Gelbard und D. S. Goldman (1961) *Arch. Biochem. Biophys.* 94, 228 - 235
- (49) D. D. Hoskins (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 4472 - 4479
- (50) P. C. Engel und V. Massey (1971) *Biochem. J.* 125, 879 - 887
- (51) P. C. Engel und V. Massey (1971) *Biochem. J.* 125, 889 - 902
- (52) P. C. Engel und J. B. Jones (1978) *Biochem. J.* 171, 51-59

- (53) P. C. Holland, A. E. Senior und H. S. A. Sherratt (1973) Biochem. J. 136, 173 - 184
- (54) C. L. Hall und H. Kamin (1975) J. Biol. Chem. 250, 3476 - 3480
- (55) C. L. Hall, L. Heijdensköld, T. Bártfai, L. Ernster und H. Kamin (1976) Arch. Biochem. Biophys. 177, 402 - 414
- (56) V. Dommes und W.-H. Kunau (1976) Analyt. Biochem. 71, 571 - 578
- (57) E. B. Noyes und R. A. Bradshaw (1973) J. Biol. Chem. 248, 3052 - 3059
- (58) J. C. Fong und H. Schulz (1976) J. Biol. Chem. 252, 542 - 547
- (59) B. Middleton (1973) Biochem. J. 132, 717 - 730
- (60) J. B. Murphy und M. W. Kies (1960) Biochim. Biophys. Acta 45, 382 - 384
- (61) A. Heil und W. Zillig (1970) FEBS Letters 11, 165 - 168
- (62) B. J. Davis (1964) Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 404 - 427
- (63) H. R. Maurer (1971) "Disc Electrophoresis", 2. Aufl., S. 44, W. de Gruyter, Berlin, New York
- (64) D. E. Williams und R. A. Reisfeld (1964) Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 373 - 381
- (65) U. K. Lämmli (1970) Nature 227, 680 - 685
- (66) N.Y. Nguyen und A. Chrambach (1977) Analyt. Biochem. 82, 54 - 62
- (67) O. Vesterberg, L. Hansén und A. Sjösten (1977) Biochim. Biophys. Acta 491, 160 - 166
- (68) J. T. Brosnan, B. Kopec und J. B. Fritz (1973) J. Biol. Chem. 248, 4075 - 4082
- (69) J. V. Dahlen und J. W. Porter (1965) Arch. Biochem. Biophys. 127, 207 - 223

- (70) D. S. Bendall und C. de Duve (1960) Biochem. J. 74, 444 - 450
- (71) W. I. Wood (1976) Analyt. Biochem. 73, 250 - 257
- (72) R. Willstätter und H. Kraut (1923) Chem. Ber. 56, 149 - 162 und 1117 - 1121
- (73) W.-H. Kunau (1973) Chem. Phys. Lipids 11, 254 - 269
- (74) H. Lindlar (1952) Helv. Chim. Acta 35, 446 - 450
- (75) M. Wenzel, H. Wollenberg und P. E. Schulze (1961) Atompraxis 7, 89 - 90
- (76) E. A. Kean (1976) Biochim. Biophys. Acta 422, 8 - 14
- (77) S. Moore und W. H. Stein (1948) J. Biol. Chem. 176, 367 - 388
- (78) A. I. Vogel (1956) in "Practical Organic Chemistry", 3. Auflage, S. 330, Longmans Green, London
- (79) P. Goldman und P. R. Vagelos (1961) J. Biol. Chem. 236, 2620 - 2623
- (80) M. E. Pullman (1973) Analyt. Biochem. 54, 188 - 198
- (81) G. L. Ellman (1959) Arch. Biochem. Biophys. 82, 70 - 77
- (82) K. Decker und F. Lynen (1955) 3. Congr. Intern. Biochim. Commun. S. 36, Brüssel (zitiert in (83))
- (83) G. Michal und H. U. Bergmeyer (1974 in "Methoden der enzymatischen Analyse" (H. U. Bergmeyer, Hrsg.), 3. Auflage, S. 2015 - 2029, Verlag Chemie, Weinheim
- (84) P. Dommès (1979) Dissertation, Köln
- (85) C. W. Ward und D. Fairbairn (1970) Develop. Biol. 22, 366 - 387
- (86) J. J. Hedrick und A. J. Smith (1968) Arch. Biochem. Biophys. 126, 155 - 164
- (87) H. R. Maurer (1971) "Disc Electrophoresis", 2. Auflage, S. 50, W. de Gruyter, Berlin, New York

- (88) R. A. Reisfeld, U. J. Lewis und D. E. Williams (1962)
Nature 195, 281 - 283
- (89) Sephadex-Ionenaustauscher, Informationsschrift der
Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala (1973) S. 20
- (90) E. A. Peterson (1970) in "Laboratory Techniques in Bio-
chemistry and Molecular Biology" (T. S. Work und E. Work,
Hrsg.) Bd. 2, S. 223 - 400, North Holland Publishing
Company, Amsterdam und London
- (91) P. C. Holland und H. S. A. Sherratt (1973) Biochem. J.
136, 157 - 171
- (92) S. J. Wakil und G. Hübscher (1960) J. Biol. Chem. 235,
1554 - 1558
- (93) T. Thunberg (1917) Scand. Arch. Physiol. 35, 163
(zitiert in (94))
- (94) H. Möllering, A. W. Wahlefeld und G. Michal (1974)
in "Methoden der enzymatischen Analyse" (H. U. Bergmeyer,
Hrsg.), 3. Auflage, S. 145 - 153, Verlag Chemie, Weinheim
- (95) F. E. Smith (1951) Science 113, 751 - 754
- (96) E. Atkinson, S. Melvin und S. W. Fox (1950) Science 111,
385 - 387
- (97) L. H. Noda, S. A. Kuby und H. A. Lardy (1953) J. Am.
Chem. Soc. 75, 913 - 917
- (98) R. J. Wieme (1974) in "Methoden der enzymatischen Ana-
lyse" (H. U. Bergmeyer, Hrsg.), 3. Auflage, S. 627 - 637,
Verlag Chemie, Weinheim
- (99) F. von der Haar (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 70,
1009 - 1013
- (100) A. L. Lehninger (1975) "Biochemistry", 2. Auflage, S. 180,
Worth Publishers Inc., New York
- (101) P. Andrews (1970) in "Methods of Biochemical Analysis"
(D. Glick Hrsg.), Bd. 18, S. 1 - 53, Interscience
Publishers, New York

- (102) P. Cerletti und M. G. Giordano (1971) in "Methods in Enzymology" (S. P. Colowick und N. O. Kaplan, Hrsg.), Bd. 18 B, S. 285 - 290, Acad. Press, New York
- (103) H. Osmundsen und J. Bremer (1977) Biochem. J. 164, 621 - 633
- (104) H. Osmundsen und J. Bremer (1978) Biochem. J. 174, 379 - 386
- (105) D. J. T. Porter und H. J. Bright (1976) in "Flavins and Flavoproteins, Preceedings of the Fifth International Symposium" (T.P. Singer, Hrsg.), S. 225 - 237, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, Oxford, New York
- (106) T. P. Singer (1976) "Flavins and Flavoproteins, Preceedings of the Fifth International Symposium", Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, Oxford, New York
- (107) T. C. Bruice (1976) *ibid.* S. 244 - 260
- (108) G. Blankenhorn (1975) Biochemistry 14, 3172 - 3176
- (109) P. Hemmrich, V. Massey und H. Fenner (1977) FEBS Letters 84, 5 - 21
- (110) K. Tanaka (1972) J. Biol. Chem. 247, 7465 - 7478
- (111) C. von Holt, M. von Holt und H. Böhm (1966) Biochim. Biophys. Acta 125, 11 - 21
- (112) H. Osmundsen und H.S.A. Sherratt (1975) FEBS Letters 55, 38 - 41
- (113) K. L. Manchester (1974) FEBS Letters 40, 133 - 139
- (114) W.-H. Kunau und F. Lauterbach (1978) FEBS Letters 94, 120 - 124
- (115) R. Bressler, C. F. Corredor und K. Brendel (1969) Pharmacol. Rev. 21, 105 - 130
- (116) J. C. Fong und H. Schulz (1978) J. Biol. Chem. 253, 6917 - 6922

- (117) H. Osmundsen (1978) FEBS Letters 88, 219 - 222
- (118) E. Gorin und S. Zendowski (1975) Biochim. Biophys. Acta 388, 268 - 276
- (119) J. K. Hiltunen, V. P. Jauhonen, M. J. Savolainen und I. E. Hassinen (1978) Biochem. J. 170, 235 - 240
- (120) J. K. Hiltunen (1978) Biochem. J. 170, 241 - 247
- (121) J. R. Williamson, S. G. Rostand und M. J. Peterson (1970) J. Biol. Chem. 245, 3242 - 3251
- (122) G. J. Raugi, T. C. Liang und J. J. Blum (1975) J. Biol. Chem. 250, 4067 - 4072
- (123) H. Wagner, G. Ritzel und K. Bernhard (1965) Helv. Chim. Acta 49, 436 - 440
- (124) K. Bernhard, K. Yekudi und H. R. Greub (1967) Helv. Chim. Acta 50, 713 - 716
- (125) W. Ecker (1970) Dissertation, Köln
- (126) P. B. Lazarow und C. de Duve (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. 73, 2043 - 2046
- (127) D. Thinès-Sempoux und A. Bormann (1978) Arch. Internat. Physiol. Biochim. 86, 456 - 457
- (128) T. Osumi und T. Hashimoto (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 83, 479 - 485
- (129) P. B. Lazarow (1978) J. Biol. Chem. 253, 1522 - 1528
- (130) R. E. Podack und W. Seubert (1972) Biochim. Biophys. Acta 280, 235 - 247
- (131) P. Lynen, U. Henning, C. Bublitz, B. Sorbo und L. Kröplin-Rueff (1958) Biochem. Z. 330, 269 - 295
- (132) K. Decker und C. Barth (1973) Molec. Cell. Biochem. 2, 179 - 188
- (133) D. G. Walker (1966) in "Essays in Biochemistry" (P. N. Campbell und G. D. Greville, Hrsg.), Bd. 2, S. 33 - 67, Acad. Press, London und New York

- (134) H. Wagner, E. Seelig und K. Bernhard (1958) Z. Physiol. Chem. 313, 235 - 243
- (135) K. Bernhard, K. Yekudi und E. Kaempf (1968) Helv. Chim. Acta 51, 373 - 376
- (136) K. Bernhard und E. Kaempf (1969) Helv. Chim. Acta 52, 1742 - 1745
- (137) W. Stoffel (1966) Naturwissenschaften 53, 621 - 630
- (138) J. F. Mead, W. H. Slaton jr. und A. B. Decker (1965) J. Biol. Chem. 218, 401 - 407
- (139) E. Klenk (1965) Adv. Lipid Res. 3, 1 - 23
- (140) G. Fila (1963) Disseration, Köln
- (141) W. Gilgenberg (1964) Dissertation, Köln

Lebenslauf

31. 7. 1949	Als Tochter des Elektrikers Karl-Hans Eggers und seiner Ehefrau Annemarie in Dinslaken, Krs. Dins- laken, geboren.
1. 4. 1956	Einschulung
1960 - 1962	Besuch der Realschule in Walsum
1962 - 1968	Besuch des neusprachlichen Mädchen- gymnasiums in Dinslaken
24. 5. 1968	Reifeprüfung
WS 1968/69 bis WS 1970/71	Studium der Chemie an der Universität zu Köln
10. 2. 1971	Diplomchemiker-Vorexamen
SS 1971 bis WS 1973/74	Studium der Chemie an der Ruhr-Universität Bochum
Mai 1973 bis April 1974	Durchführung der Diplomarbeit am Institut für Physiologische Chemie I unter Anlei- tung von Herrn Prof. Kunau und Herrn Prof. Pfeleiderer
26. 4. 1974	Diplom-Hauptprüfung im Fach Chemie
März 1975 bis Dezember 1978	Durchführung der vorliegenden Doktor- arbeit am Institut für Physiologische Chemie I unter Anleitung von Herrn Prof. Kunau

